



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Master 2 BIOMAN

Spécialité : Biotechnologies Microbiennes

Manel NOUACER

## **Caractérisation des facteurs de transcription responsables de la virulence chez *Toxoplasma gondii***

*Sous la direction de*

*Mathieu GISSOT chargé de recherche CNRS classe 1*

Stage du 27 janvier 2014 au 27 juin 2014

Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Toxoplasme dirigé par Stanislas Tomavo, Equipe 1 du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, CNRS UMR 8204 –INSERM U1019, Institut Pasteur de Lille



## Remerciements

Je remercie vivement, le Docteur Stan TOMAVO de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire de Toxoplasma, et de m'avoir permis d'y réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de mémoire Mathieu GISSOT, et le remercier pour m'avoir encadrée, orientée, aidée, conseillée et enfin pour sa patience.

Je remercie Joelle DUFLOT, Joyce AL KAYAM, Lamba Omar SANGARE, Flavie COURJOL, Kannan VENUGOPAL, de m'avoir encouragé, et soutenu pendant mon stage.

Je remercie, Thomas MOUVEAU, Maika DEFFIEU, Belinda BRUST, Pierre-julien SOLVES, Sabrina MARION, pour la bonne humeur et leur chaleureuse présence au laboratoire.

Je remercie mes très chers parents Youssef et Lynda, qui ont toujours été là pour moi, «Vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts. Vous m'avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Je suis redevable d'une éducation dont je suis fière».

Un grand merci à mon époux Mahdi, pour sa patience, sa compréhension, son soutien de tous les jours, son amour.

## ***Abréviations :***

µm : micromolaire

mM : Milimolaire

*TFN: Tumor necrosis factor*

*DL : Dose létale*

MIC: Microneme ROP: Rhoptrie

AP2: Apetala 2

KO: knockout

K-IN: knockin

HFF: Human Foreskin Fibroblast

VERO : Verda Reno

LIC : Ligase Independent Cloning

*KCL: Chlorure de potassium*

*K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Potassium Hydrogen Phosphate*

EGTA : Ethylene glycol tetraacetic acid

MgCl<sub>2</sub> : chlorure de magnésium

CaCl<sub>2</sub> : chlorure de calcium

KOH : hydroxyde de potassium

KV: kilo Volt.

Cm: centimetre

PFA : PARA acid-formaldehyde

## **Table des matières**

<b>Remerciements</b> .....	
<b>Abréviations</b> .....	
<b>Table des matières</b> .....	
<b>Introduction</b> .....	1
<b>I. Historique :</b> .....	1
<b>II. Phylogénie du parasite</b> .....	1
<b>III. Symptomes et traitements :</b> .....	2
a) Symptômes .....	2
Toxoplasmose congénitale .....	2
Toxoplasmose acquise .....	2
b) Traitements .....	2
<b>IV. Stade Parasitaires</b> .....	3
1. Sporozoite .....	3
2. Tachyzoite .....	3
3. Le bradyzoite .....	4
4. Développement des tachyzoites en bradyzoites .....	4
<b>V. Génotype du parasite</b> .....	5
<b>VI. Cycle biologique de <i>Toxoplasma gondii</i></b> .....	5
1. Le cycle sexué .....	5
2. Le cycle asexué .....	6

<b>VII. Ultrastructure de <i>T.gondii</i></b>	<b>7</b>
<b>VIII. Cycle cellulaire de <i>T.gondii</i></b>	<b>7</b>
<b>IX. Invasion et Virulence chez <i>Toxoplasma gondii</i></b>	<b>8</b>
<b>X. Objectifs du stage</b>	<b>10</b>
<b>Matériels et Méthodes :</b>	<b>11</b>
<b>I. Culture cellulaire :</b>	<b>11</b>
1. Culture et entretien des parasites	11
2. Purification des parasites	11
<b>II. BIOLOGIE CELLULAIRE</b>	<b>11</b>
1. Transfection des parasites sauvages:	11
2. Sélection des parasites	12
3. Immunofluorescence indirecte sur les parasites intracellulaires	12
<b>III. BIOLOGIE MOLECULAIRE</b>	<b>12</b>
1. Clonage dans le vecteur Pg140 pour la réalisation d'un knockout inducible.	12
2. Clonages dans le vecteur pLIC-HA et pLIC-TAP de l'insert AP2X-5 pour les stratégies de « remplacement allélique ou Knock-In »	13
<b>IV. Biochimie :</b>	<b>15</b>
1. Purification des protéines :	15
2. Précipitation des protéines	15
3. Immuno-empreinte (Western blot)	15
b) Electrotransfert	16
c) Détection des protéines	16

4.ChIP(Immunoprécipitation de la chromatine des parasites intracellulaire).....	17
PCR quantitative .....	17
<b>Résultats .....</b>	<b>18</b>
<b>I. Interaction de AP2X-5 avec AP2XI-5 .....</b>	<b>18</b>
<b>II. Expression de AP2X-5 et suivie du cycle cellulaire.....</b>	<b>19</b>
<b>III. Analyse d'immunoprecipitation de chromatine (CHIP) .....</b>	<b>21</b>
<b>IV. Clonage dans le vecteur Pg140 pour la réalisation d'un knockout inducible</b>	<b>22</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>24</b>
<b>Références Bibliographique.....</b>	<b>27</b>
<b>Résumé</b>	
<b>Annexe</b>	

## Introduction



La toxoplasmose est une maladie due à l'infection par un parasite (*Toxoplasma gondii*). Elle est habituellement transmise à l'homme par les animaux domestiques, en particulier les chats, ou par l'ingestion de viande mal cuite. C'est une maladie bénigne pour la plupart des êtres humains, mais elle peut parfois présenter des complications.

## **I. Historique :**

Il y a une centaine d'années ce micro-organisme aujourd'hui appelé *Toxoplasma gondii* a été observé pour la première fois par Laveran (en 1900) où il a été isolé dans les tissus de *Ctenodactylus gundi*, un rongeur d'Afrique du Nord (figure1, page 1 BIS) (Nicolle et Manceaux 1908).

Cette découverte ne sera présentée le 26 octobre 1908 par Laveran, à l'Académie des Sciences de Paris.

en parallèle et à peu près au même moment, A. Splendore observe ce parasite à la suite de la mort du lapin de laboratoire, à Sao Paulo (Splendore, 1909). La publication de ces résultats se fera le 16 juillet 1908. Le nom de ce parasite a été proposé par Nicolle et Manceaux en 1909 (Nicolle et Manceaux 1909). Il doit son nom d'une part à sa forme arquée, *Toxoplasma* du grec : toxon= arc et plasma= créature, et d'autre part au petit rongeur, *gondii* : *T. gondii*

Il fut isolé chez l'homme par Wolf *et al.* (1939). Le cycle biologique du toxoplasme n'est établi que vers la fin des années 60 par Hutchison *et al.* (1970).

Le chat a été identifié comme l'hôte définitif par plusieurs groupes de chercheurs de façon indépendante, y compris Frenkel *et al.* (1970).

## **II. Phylogénie du parasite**

*T. gondii* est un protozoaire intracellulaire obligatoire qui appartient au phylum des Apicomplexa (Livine 1970), dont la principale caractéristique est la présence d'un complexe apical permettant l'entrée active du parasite dans les cellules hôtes. Le phylum inclut de nombreux pathogènes importants, tels que *Cryptosporidium* et *Plasmodium*. Au sein des Apicomplexa, *T. gondii* est classé parmi

-La classe des Sporozoea (Leukart 1878).

-Sous classe Coccidea, (Leukart 1878).



**Figure1 : photo de rongeurs *Ctenodactylus gundi*.**

- Ordre des Eucoccidea (Dubasc 1910).
- Sous ordre des Eimariida (Leger 1911).
- Famille des Sarcocystidae (BussierasChermette,1992).
- Genre Toxoplasma (Nicolas et Manceaux 1909).
- L'espèce *gondii*.

### **III. Symptomes et traitements :**

#### **a)Symptômes**

##### ***Toxoplasmose congénitale***

Elle est observée surtout chez des femmes enceintes, car elle correspond à l'infection du fœtus pendant la gestation. Elle peut conduire à des avortements, et à la mort du bébé (mort-nés ou très peu de temps après leur naissance). La toxoplasmose congénitale est connue en particulier chez la femme, mais elle est également présente chez les animaux. Cependant, le passage Trans placentaire n'est pas obligatoire, et même s'il a lieu, le fœtus peut naître sain.

##### ***Toxoplasmose acquise***

###### **a) Formes chroniques**

Elle peut se manifester par des troubles oculaires, nerveux. Ces formes sont rarement diagnostiquées chez les animaux.

###### **b) Formes aiguës**

Les symptômes sont très polymorphes, et peuvent être observés chez des individus sains ou immunodéprimés, ainsi que chez les animaux. La toxoplasmose se manifeste par de la fièvre, accompagnée de méningo-encéphalite ou broncho-pneumonie, ou des troubles digestifs.

#### **b) Traitements**

La toxoplasmose, aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, peut être traitée à l'aide des médicaments suivant:

Toxoplasmose acquise

La toxoplasmose acquise chez l'immunocompétent, hors grossesse ne nécessite

généralement pas de traitement. La Rovamycine® peut être prescrite en cas de persistance de signes cliniques.

Si la séroconversion survient pendant le début de la grossesse, avec un test positif (toxoplasmose congénitale prouvée), le traitement pourra être soit Fansidar®, soit Malocide®-Adiazine® (associés à de l'acide folique –Osfolate®- per os). L'interruption médicale de grossesse n'est à discuter qu'en cas de lésions fœtales. Au 3ème trimestre, le traitement peut d'emblée faire appel au Fansidar® ou à l'association Malocide®-Adiazine®.

Toxoplasmose oculaire

Les médicaments utilisés sont principalement le Malocide® et l'Adiazine®. (BRENIER, PELLOUX.;2003)

#### **IV. Stade Parasitaires**

*T. gondii* est un parasite intracellulaire obligatoire, et possède un cycle hétéroxène facultatif entre les félins (hôte définitif) et les animaux homéothermes (hôte intermédiaires). Le cycle de développement comprend 3 stades évolutifs :

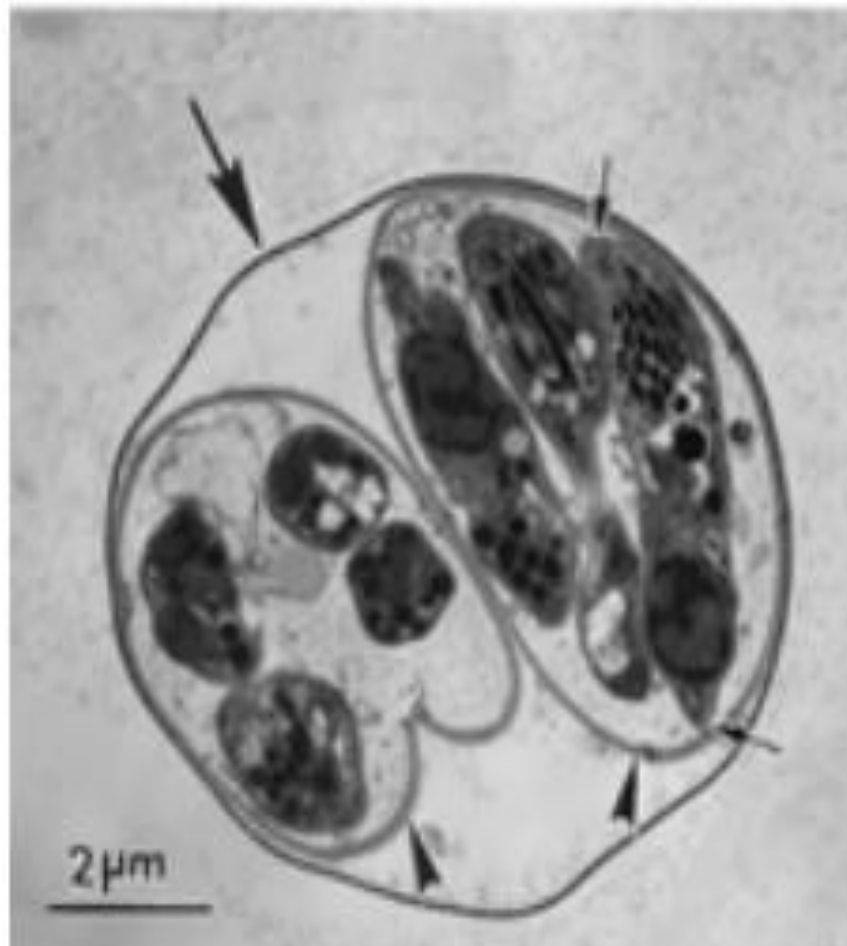
##### **1. Sporozoite (figure 2, page 3 BIS)**

Issu de la production sexuée du parasite qui a lieu dans les cellules de l'épithélium intestinal de l'hôte définitif. Il est éliminé dans le milieu extérieur sous forme d'oocystes contenant les sporozoites dans les fèces du chat. Il peut résister un an dans un sol humide (Dubey *et al.*,1998)

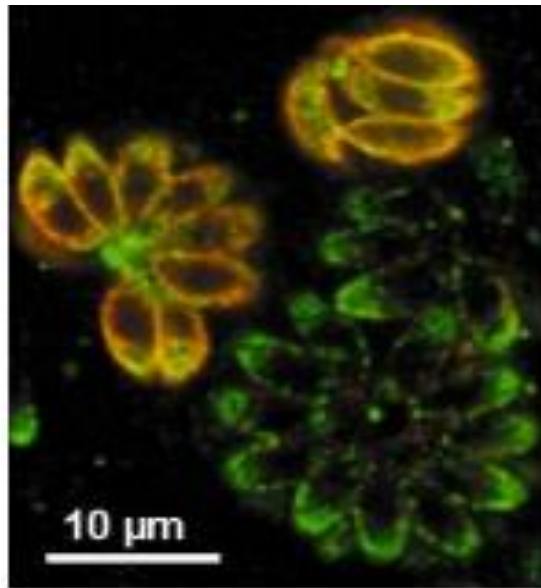
##### **2. Tachyzoite (figure 3, page 3 TER)**

Il se présente sous forme de croissant de 5 à 10 µm de long. C'est la forme intracellulaire de prolifération active, présente pendant la phase aiguë de l'infection. Il infecte les cellules de l'hôte et se multiplie au sein d'une vacuole parasitophore. La partie antérieure présente une structure caractéristique du phylum des Apicomplexae : un complexe apical qui comporte un élément participant à la mobilité du parasite et à sa pénétration dans les cellules, le conoïde, et des organelles à activité sécrétoire (rhoptries, micronèmes et granules denses).

Le tachyzoite a la capacité de pénétrer dans tout type cellulaire. D'une manière, très



**Figure 2: Oocyste sporulé de toxoplasme observé en microscopie électronique.** (Dubey, 1998). Oocyste sporulé protégé par sa paroi (grande flèche) contenant deux sporocystes (têtes de flèches) renfermant chacun quatre sporozoïtes (petites flèches).



**Figure 3** :Tachyzoïtes intracellulaires en rosette.( Meissner et al.,2002).

rapide (moins de 20 secondes).Après pénétration, le parasite s'entoure d'une vacuole où il se multiplie de façon asexuée par endodyogénie (Nishi *et al.*,2008) répétée. Ainsi, du parasite mère émerge deux parasites filles pour chaque cycle cellulaire (Burunet.,2007).

### 3. **Le bradyzoïte (Figure 4, page 4BIS)**

Lors de la phase chronique de l'infection, il résulte de la transformation de tachyzoïte. Les bradyzoïtes sont différents des tachyzoïtes sur le plan structural: noyau en position postérieure, présence de plus de grains d'amylopectine. Le bradyzoïte a une apparence plus fine et moins sensible à la destruction par les enzymes protéolytiques. Cette transformation est accompagnée par la modification de la vacuole ou la membrane qui devient plus épaisse, permettant la formation du kyste toxoplasmique, qui a une structure sphérique intracellulaire. (Burunet.; 2010).

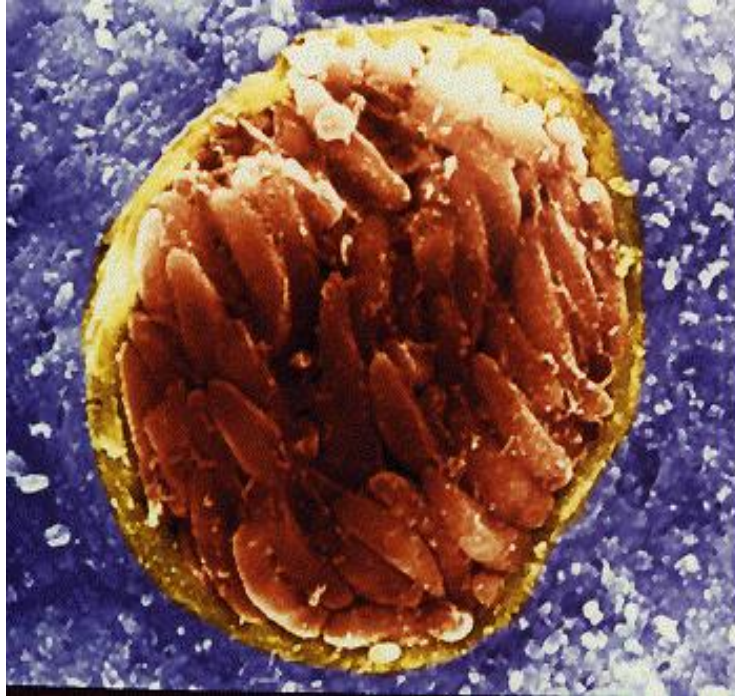
### 4. **Développement des tachyzoïtes en bradyzoïtes**

La transformation des tachyzoïtes en bradyzoïtes et de la vacuole parasitophore en kyste est un phénomène qui intervient très rapidement (dès 48 heures en culture cellulaire). Les kystes peuvent se former dans n'importe quel type cellulaire mais persisteront préférentiellement dans les neurones, les astrocytes, les cellules musculaires et les cellules rétinienne.

Il est admis que les kystes peuvent persister pendant toute la vie de l'hôte. A la mort de la cellule hôte, la paroi du kyste se rompt et les bradyzoïtes sont libérées dans le milieu extracellulaire. Si le système immunitaire est efficace, certains toxoplasmes seront détruits par le système immunitaire avant de pouvoir pénétrer dans les nouvelles cellules, d'autres pourront se réfugier dans les cellules voisines et donner de nouveaux kystes (SiniSkariah. ; 2010).

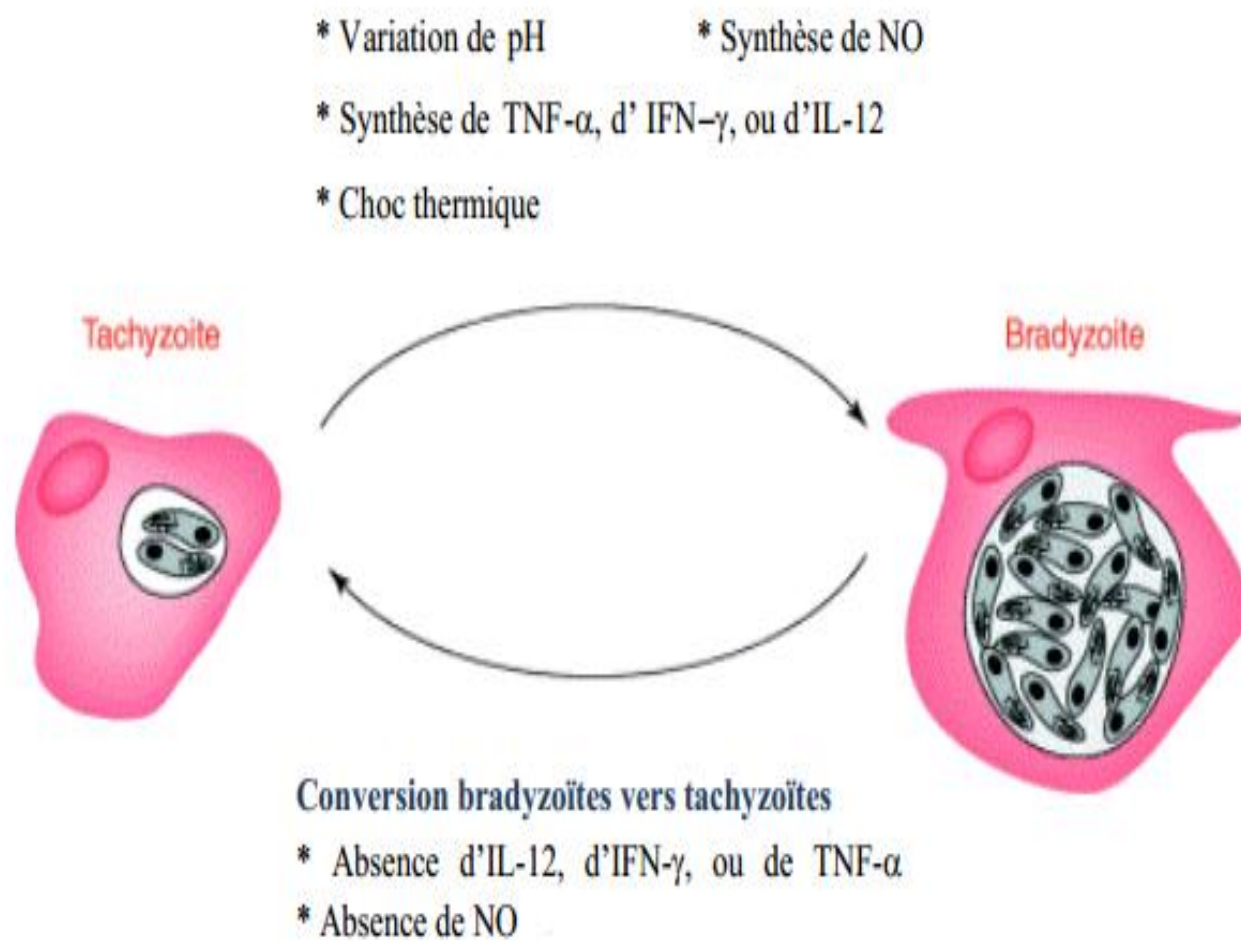
L'élément déclenchant majeur de cette transformation est une inhibition de l'activité mitochondriale des parasites sous l'influence de protéines de stress du toxoplasme induites par différents stimuli tels que l'IFN- $\gamma$ , le NO ou le TNF (Tomavo., 2001). (Figure 5, page 5 BIS).

Aussi de nombreux facteurs peuvent favoriser l'initiation de la conversion du stade tachyzoïtes au stade bradyzoïtes tels que les variations de pH, les chocs thermiques (BRUNET., 2010).



**Fugure 4 : Bradyzoïtes dans un kyste tissulaire de cerveau souris infectée.**





**Figure 5 : Schéma du processus d'interconversion (Lyons *et al.*, 2002)**

## **V. Génotype du parasite**

Une seule espèce a été décrite au sein du genre *Toxoplasma* mais, plus de 200 isolats ou souches de virulence variable ont été isolées. La pathogénicité des souches est définie par l'étude de la virulence chez la souris: détermination des D L50 (doses de parasites minimales entraînant la mort de 50% des animaux) et DL100 (100% des souris infectées meurent). La capacité à former des kystes représente aussi un critère de différenciation entre les génotypes car il existe une relation entre la pathogénicité d'une souche et son aptitude à la kystogénèse :

-les souches kystogéniques sont moins pathogènes car les parasites sont contenus dans la paroi kystique, évitant ainsi leur dissémination, et limite leur multiplication.

-les souches peu kystogènes, sont plus virulentes, car leur multiplication est rapide et entraîne la destruction de leurs cellules hôtes. C'est le cas de la souche RH (isolée en 1941 par Sabin à partir d'un cas d'encéphalite humaine aiguë), que j'ai utilisée au cours de mon stage.

La majorité (95%) des isolats analysés, est regroupée en trois génotypes principaux : type I, II, III. Ces souches diffèrent très peu génétiquement (moins de 1%) (MuratHökelek .,2013). Les principales caractéristiques sont représentées dans le tableau 1 page 5 ter. (Dardé., 2004).

## **VI. Cycle biologique de *Toxoplasma gondii***

### **1. Le cycle sexué (figure 6 A, page 6 BIS)**

L'hôte définitif (le chat ou plus généralement, les félidés) s'infecte après ingestion d'oocystes matures qui se trouvent dans la terre, les végétaux ou encore par de petits rongeurs ou des oiseaux contenant des kystes par carnivorisme. Les sporozoïtes (contenus dans les oocystes) ou les bradyzoïtes (contenus dans les kystes) évoluent rapidement en tachyzoïtes. Ceux-ci vont proliférer, et à la dernière division nucléaire, des cellules filles appelées mérozoïtes se forment. Ensuite ils seront libérés dans l'épithélium de l'iléon de l'hôte définitif. (Ferguson., 2002)

Les mérozoïtes se multiplient par schizogonie, processus au cours duquel les noyaux parasites se divisent dans un même cytoplasme avant une fragmentation tardive du cytoplasme. Après leur libération, les mérozoïtes se différencient en gamètes (microgamètes mâle et macrogamètes femelle) et initient le cycle sexué.

Type	Principales caractéristiques
Type I	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Rarement isolé (10% des collections d'isolats)</li> <li>Origine principalement humaine</li> <li>-Europe, Etats-Unis, Amérique du Sud</li> <li>Comportement in vivo : virulence importante chez la - Souris (DL100&lt;10 tachyzoïtes)</li> <li>-Comportement in vitro : fort taux de multiplication, interconversion tachyzoïte ↔ bradyzoïte réduite</li> </ul>
Type II	<ul style="list-style-type: none"> <li>-80% des collections d'isolats</li> <li>-Origine humaine et animale (domestique et sauvage)</li> <li>Europe, Etats-Unis</li> <li>-Comportement in vivo : avirulence, infection chronique chez la souris avec persistance de kystes tissulaires</li> <li>-Comportement in vitro : faible taux de multiplication, interconversion tachyzoïte-bradyzoïte avec formation de kystes en culture cellulaire</li> </ul>
Type III	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Génotypes recombinants et génotypes atypiques</li> <li>Rarement isolé</li> <li>-Origine humaine (association avec des toxoplasmoses souvent sévères)</li> <li>-Origine animale (hôtes sauvages inhabituels)</li> <li>Zones géographiques peu étudiées (régions intertropicales +++)</li> <li>-Comportement in vivo : virulence intermédiaire entre types I et II</li> <li>-Comportement in vitro : peu étudié</li> </ul>

**Tableau 1: Principales caractéristiques biologiques et épidémiologiques des génotypes de T. gondii (Dardé, 2004).**

Lors de la microgamétogenèse, le noyau du microgamonte mâle se divise et produit 10 à 21 parasites, qui vont utiliser leurs flagelles pour aller à la rencontre des macrogamètes matures.

La fécondation des macrogamètes femelles par les microgamètes mâle donne naissance à des oocystes immatures qui sont libérés dans la lumière intestinale, puis éliminés par les fèces des chats ou félins dans l'environnement, où ils subiront leurs maturations.(Dumètre et Dardé., 2013)

## **2. Le cycle asexué (figure 6 B, page 6 BIS)**

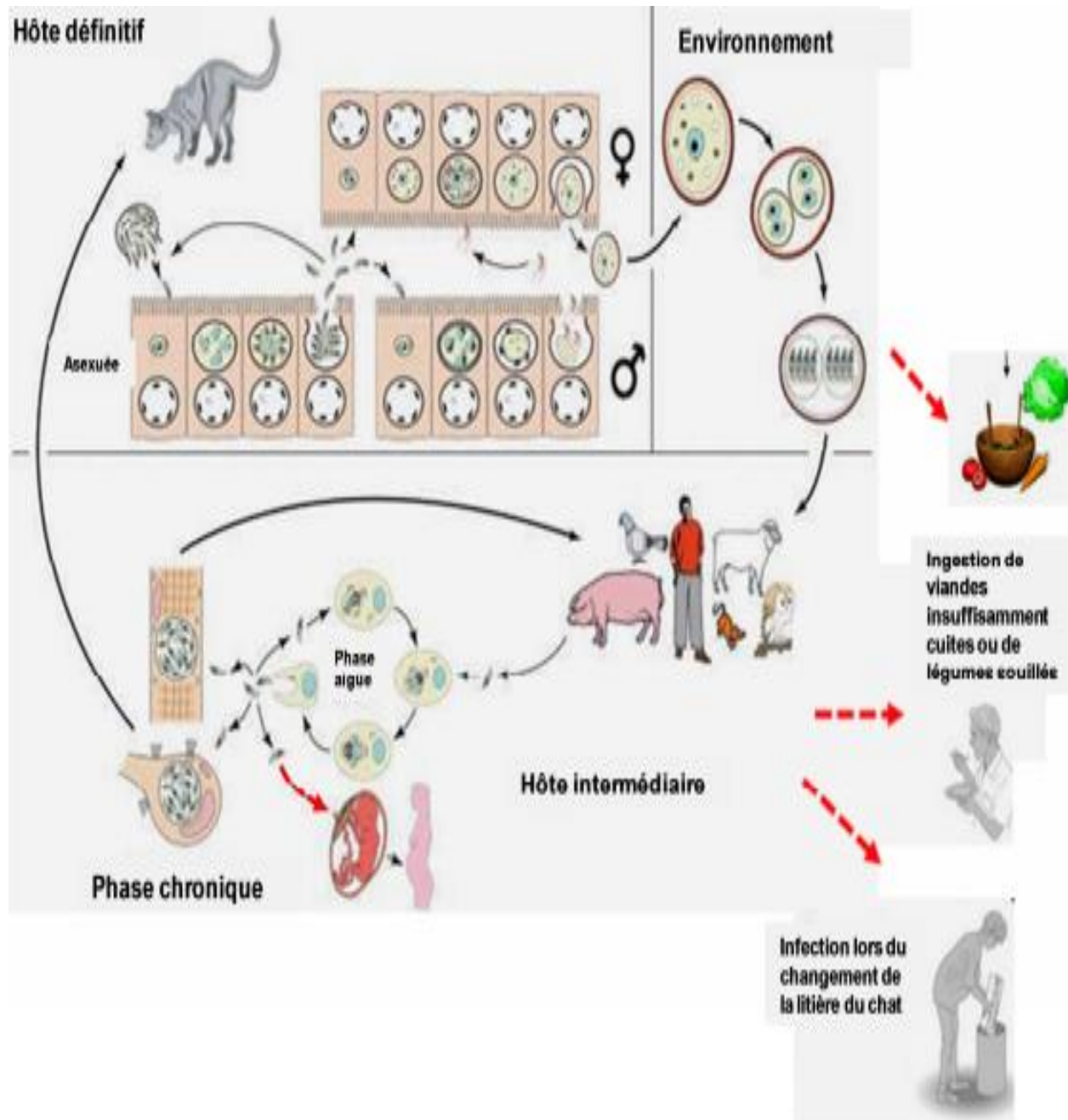
Chez les hôtes intermédiaires, l'infection se fait essentiellement par voie orale, après l'ingestion soit d'oocystes matures provenant d'aliments souillés, soit de kystes contenus dans des viandes infectées.

Après digestion de la paroi des oocystes ou des kystes dans l'estomac les parasites sont libérées et se différencient rapidement en tachyzoïtes. le tachyzoïte est la forme à prolifération rapide du parasite, responsable de la phase aiguë de l'infection. L'entrée du tachyzoïte est suivie par la formation d'une vacuole parasitophore par invagination de la membrane plasmique de la cellule-hôte. (Carruthers et Boothroyd., 2007)

Ils se disséminent dans l'organisme par voie sanguine et lymphatique. A l'intérieur des cellules, le parasite se multiplie par endodyogénie (deux cellules filles se forment à l'intérieur de la cellule mère). Après 6 ou 7 cycles de division au sein de la vacuole, il y a lyse de la cellule hôte et libération de 64 à 128 parasites (Gordon et *al.*, 2008; Nishi et *al.*, 2008). Chaque cycle de division dure de 6 à 8 heures. Les parasites libres vont alors infecter une nouvelle cellule hôte et débiter un nouveau cycle lytique. Les tachyzoïtes se différencient en bradyzoïtes sous la pression du système immunitaire.

Ces derniers correspondent à la forme quiescente du parasite. Ils sont responsables de la phase chronique de l'infection et vont perdurer toute la vie de l'hôte, sous forme de kystes qui peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de bradyzoïtes dans les tissus nerveux et musculaires.

(A)



**Figure 6 : Diagramme représentant le cycle de vie de *Toxoplasma gondii*** a)Le chat est l'hôte définitif au développement sexuel se produisant dans l'intestin grêle à l'origine des oocystes. Ceux-ci contaminent l'environnement extérieur. (b) Dans l'hôte intermédiaire, le parasite subit seulement le développement asexuée. Une phase aiguë est suivie d'une phase chronique.

## **VII. Ultrastructure de *T.gondii***

L'invasion des cellules hôtes dépend des différents organites du complexe apical qui se localise au pôle antérieur du parasite. Ce complexe apical est composé des micronèmes, des rhoptries, des anneaux polaires et préconoïdaux et du conoïde. Il joue un rôle mécanique dans l'invasion et permet la pénétration de la cellule hôte par le parasite (Figure 7, page 7BIS). Les micronèmes et les rhoptries, ainsi que les granules denses sont des organites de sécrétion spécifiques aux Apicomplexa, ils jouent un rôle important dans la mobilité, l'adhésion à la cellule hôte et l'établissement de la vacuole parasitophore (Black et Boothroyd., 2000).

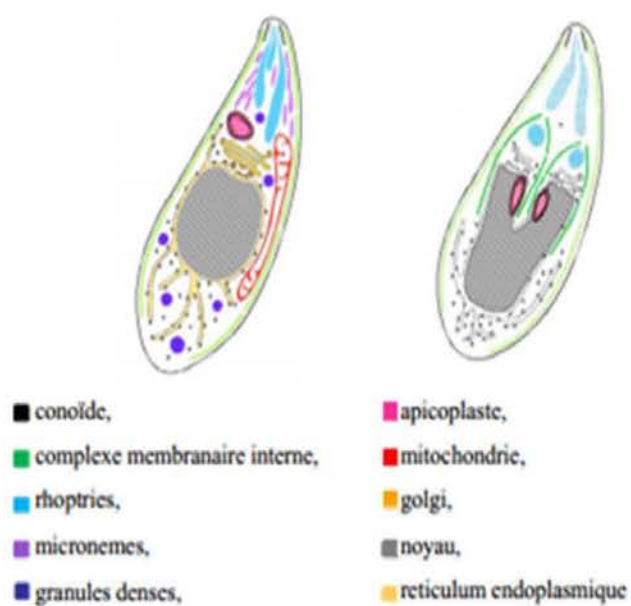
## **VIII. Cycle cellulaire de *T.gondii***

*T. gondii* est caractérisé par la présence de 3 phases dans son cycle cellulaire : les phases G1 et S : qui représentent respectivement environ 60 et 30 % d'un cycle de division (Radke et al., 2001). La phase M qui caractérise la phase de cytokinèse (Sautel et al. 2007). (figure 8, page 7 ter)

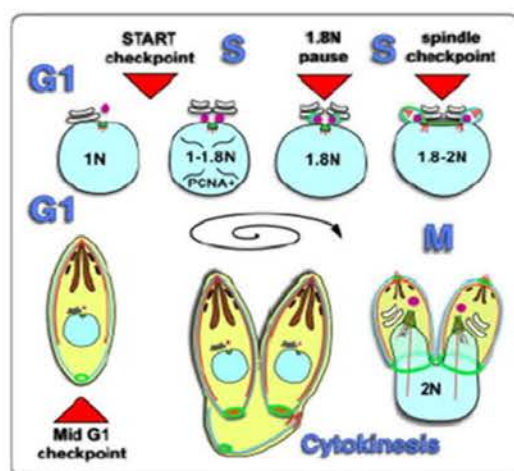
**phases G1:** La division des tachyzoïtes est initiée par un élargissement et le doublement de l'appareil de Golgi (Pelletier et al., 2002, White et al., 2005 et Hartmann et al., 2006). Cet événement est suivi par la duplication du centriole sur le côté basal du noyau qui va migrer par la suite vers le côté apical du noyau. Après la duplication, le centrosome migrent vers le côté apical du noyau en phase S.

**phase S :** Lors de cette phase les pôles du fuseau mitotique sont intégrés dans l'enveloppe nucléaire dans le centrocone (Gubbels et al., 2006), et les microtubules s'étendent à travers l'enveloppe nucléaire. La Duplication des pôles du fuseau se produit au sein de l'enveloppe nucléaire, médié par les microtubules (Gubbels et al., 2006). Enfin l'assemblage du fuseau s'initie à la fin de la phase S avec l'apparition d'une sous-population quasi-diploïde.

**Phase M :** Lors de cette phase il se produit un bourgeonnement interne qui conduira à la formation des cellules filles. Elle se distingue par la formation des cytosquelettes filles (Striepen et al., 2007). La première caractéristique discernable de la formation du cytosquelette fille est la formation de MORN1 qui se développe sous la forme d'un disque plat, ce qui correspond au début de complexe basal (Gubbels et al., 2006, Hu et al., 2006 et Hu, 2008) à côté du centrosome. Après, MORN1 suit la formation du complexe apical avec son noyau conoïde, il se déplace ensuite vers la



**Figure 7: Ultrastructure de *T.gondii* (Nishi et *al.*, 2008)**



**Figure 8: Représentation du cycle cellulaire du *T. gondii*.** (Gubbels et *al.*, 2008) Le contenu en ADN du noyau est indiqué pour chaque phase de cycle ainsi que les points de contrôle identifiés. En rouge les microtubules; turquoise, le complexe membranaire interne; bleu, le noyau; vert, MORN1; point violet, le centrosome; orange, la centrine; marron, les rhoptries; noir, les micronèmes; blanc, le Golgi.



direction apicale et au même moment l'anneau de base commence la migration vers le noyau. Ces événements coïncident avec le début de la mitose. Au cours des derniers stades de division des cellules filles, la centrine commence à se former au bord basal où se trouve l'anneau qui va initier la séparation des cellules filles. ( Hu., 2008 )

## ***IX. Invasion et Virulence chez Toxoplasma gondii***

*Toxoplasma gondii* est un parasite intracellulaire obligatoire, sa virulence est liée à la capacité à adhérer et envahir les cellules ce qui est capitale pour sa survie. *Toxoplasma gondii* est capable d'infecter toutes les cellules nucléées dont les macrophages. L'étape primordiale pour la pathogenèse de ce parasite chez l'homme consiste en la prolifération du stade tachyzoïte.

L'invasion débute par la formation d'une vacuole parasitophore dérivée du plasmalemme de la cellule hôte, mais qui a subi des modifications par le parasite pour qu'elle soit exclue du trafic membranaire intracellulaire, permettant au parasite d'être isolé des autres compartiments vésiculaires, et d'échapper aux défenses de l'hôte (les vacuoles lysosomales).

Le tachyzoïte possède une machinerie de protéines de virulence et d'invasion qui lui sont primordiales pour sa survie chez l'hôte humain.

Ces protéines sont produites et exportées dans deux organites essentielles à la virulence : les Micronèmes, et les Rhoptries.

### **Micronèmes**

Micronèmes sont des organites sécrétoires apicaux spécialisés. On retrouve 50 à 100 micronèmes chez le tachyzoïte. Ils sont présumés jouer un rôle prédominant dans la première phase du processus d'invasion en déchargeant adhésines capables d'interagir avec les récepteurs de la cellule hôte. La sécrétion des protéines du micronème est le premier événement à être visualisé. Ceci est rapidement suivi de la décharge des protéines de rhoptries.

### **Rhoptries**

On trouve 6 à 12 rhoptries au pôle apical de chaque parasite. Ces longs organites mesurent  $2 \times 0,2 \mu\text{m}$ . Ils contiennent des protéines essentielles à l'établissement de la membrane parasitophore ainsi qu'au contrôle de la cellule hôte par le parasite.

Des approches de génétique inverse ont identifié plusieurs gènes qui sont importants pour l'infection, y compris **GRA2** (Mercier.,1998), **M2AP** (Huynh.,2003), **MIC1** et **MIC3** (Cérède .,2005). Les protéines de rhoptries **ROP18** (une kinase qui contrôle de la prolifération intracellulaire), **ROP16** (une kinase contrôlant la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte contre le parasite) (Lebrun.,2007), et **ROP5** (Weilhammer.,2011) sont aussi des effecteurs importants de la virulence (Figure 9, page 9 BIS). La perturbation de l'expression de ces gènes entraîne une diminution de la virulence chez la souris.

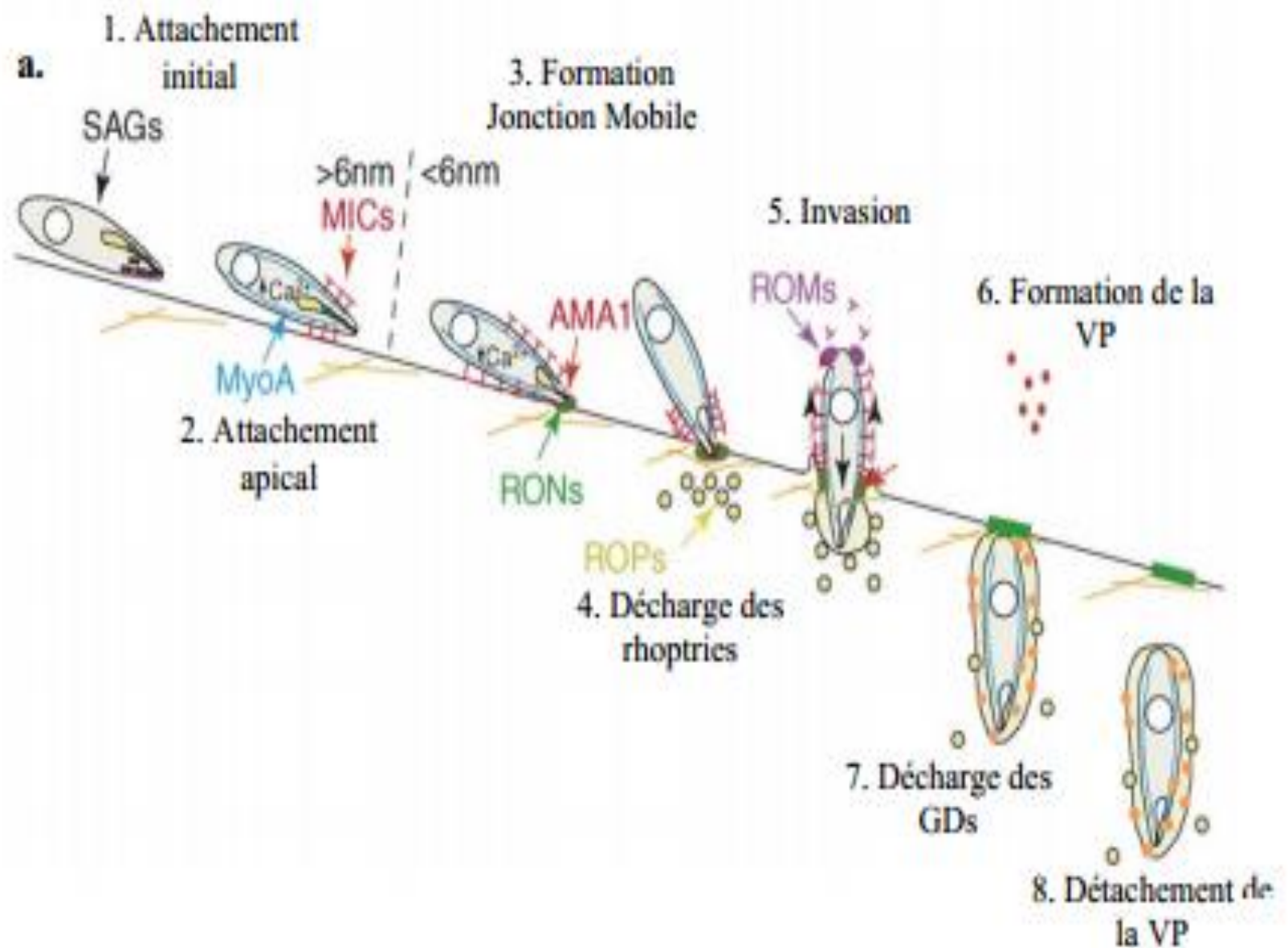
Les micronèmes et rhoptries étant produites *de novo* à chaque cycle cellulaire, les protéines destinées à celles-ci doivent être produites dans un laps de temps court afin d'être insérées dans ces organelles. Ces événements se produisent durant la phase S et M du cycle cellulaire de *T. gondii*.

Les facteurs responsables du contrôle et de l'établissement de l'expression des gènes codant pour les protéines de micronèmes et de rhoptries ne sont pas connus. Cependant, ces dernières années une nouvelle famille de facteur putatif de transcription a été identifiée. Elle possède un ou plusieurs domaines AP2 (Hands-Taylor.,2010), découverts précédemment chez les plantes où elles jouent un rôle dans les réponses au stress de l'environnement et la thermo tolérance.

Ce domaine de liaison à l'ADN de type AP2 a été retrouvé chez d'autres Apicomplexes tel que *Plasmodium* pour lequel il joue un rôle de régulateur de la transcription. Il est nécessaire à l'activation d'un ensemble de gènes qui engagent le développement du parasite.

Chez *T.gondii* une soixantaine de protéines contenant ce domaine ont été identifiées. Parmi eux, le facteur de transcription AP2XI-5 (Gissot *et al.*, 2013) a la particularité d'être exprimé tout le long du cycle cellulaire mais ne se fixe que sur les promoteurs des gènes des micronèmes et rhoptries (dont le transcrit est exprimé pendant la phase S et M du cycle cellulaire du parasite).

Pour essayer de comprendre la restriction de liaison de la protéine AP2XI-5 aux promoteurs actifs pendant les phases S et M, des études préliminaires ont été menées afin de rechercher des partenaires protéiques d'AP2XI-5. Parmi les partenaires d'AP2XI-5, d'autres facteurs de transcription putatifs de la famille des



**Figure 9: Etapes de l'invasion de la cellule hôte par la forme tachyzoïte.** Mise en évidence des protéines sécrétées, impliquées à chaque étape de invasion. (VP : Vacuole Parasitophore, GDs : Granules Denses) (Adapté de Carruthers and Boothroyd, 2007)

AP2 ont été identifiés. Notamment, le gène codant pour la protéine AP2X-5 a retenu notre attention du fait de son expression restreinte aux phases S et M du cycle cellulaire.

L'objectif de mon stage est la caractérisation du rôle de ce nouveau facteur de transcription AP2X-5.

## ***X. Objectifs du stage***

Pour déterminer le rôle d'AP2X-5, nous allons tenter de créer une construction en vue de faire un KO inducible de ce gène. Afin de réaliser cette construction nous allons placer le gène entre deux séquences loxP qui pourront être reconnues par une recombinase de type Cre. Ce qui permettra d'exciser le gène et d'étudier l'effet de la mutation.

Nous allons tenter d'identifier à quel moment du cycle cellulaire la protéine AP2X-5 est exprimée. Pour cela nous allons réaliser un remplacement allélique dans le génome du parasite grâce à une construction dans laquelle la copie du gène est placée en amont d'une étiquette HA. Différents marqueurs du cycle cellulaire nous permettront ensuite de suivre l'expression de ce gène lors des phases S, M, G1 du cycle cellulaire.

Troisièmement, à l'aide d'une immunoprécipitation d'une version étiquetée TAP, nous allons caractériser les protéines s'associant avec AP2X-5.

Enfin on réalisera des analyses de d'immunoprécipitation de la chromatine afin d'identifier les régions chromosomique où ce facteur se lie à l'ADN.

## Matériel et Méthodes

## **I. Culture cellulaire :**

### **1. Culture et entretien des parasites :**

Les parasites sont cultivés sur des cellules de fibroblastes (HFF ou Human Foreskine Fibroblast), ou cellule de rein du singe (vero pour Verda Reno :rein vert) en milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium®*) supplémenté par du sérum de veau foetal de 5- 10%, de la Penicilline/Streptomycine ( $10^4$  unité/ml) et 2 mM de L-glutamine (*Gibco®*). Les parasites cultivés sont des tachyzoites de la souche RH de type I, dont le gène codant pour la protéine Ku80 a été délété afin d'accroître la probabilité des recombinaisons homologues. Ils sont maintenus par infection d'un tapis de cellule confluentes à 37°C, sous 5% de CO<sub>2</sub>, en atmosphère humide et sont passés toutes les 48 heures après la lyse des cellules HFF.

### **2. Purification des parasites :**

Après la lyse des cellules HFF ou VERO infectées par les parasites, le tapis cellulaire est décroché avec un grattoir, le surnageant est passé par une seringue pour lyser mécaniquement les cellules puis filtré à travers une membrane millipore 3 µm (polycarbonate de porosité 3 µm, *Whatman®*) ou à travers un filtre à base de laine de verre. Une fois les parasites purifiés, ils peuvent être utilisés dans différentes techniques de biologie cellulaire ou de biochimie.

## **II. BIOLOGIE CELLULAIRE :**

### **1. Transfection des parasites sauvages:**

La transfection des parasites se fait par électroporation de 10 millions de parasites extracellulaires en présence de 20-100 ng d'ADN plasmidique (cloner dans le pLiC). Les parasites sont centrifugés durant 15 minutes à 2400rpm, et le surnageant éliminé. Après deux lavages dans du milieu de transfection appelé Cytomix [120mM KCL; 10mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 ; 25mM Hepes pH 7,6 ; 2mM EGTA pH 7,6 ; 5mM MgCl<sub>2</sub> ; 0,15mM CaCl<sub>2</sub> ; pH ajusté à 7,6 avec du KOH], les parasites sont comptés sur cellule de Malassez et repris par le volume adéquat dans du cytomix complété par 2mM final d'ATP et 5mM final de Glutathion. Le mélange de parasites et d'ADN plasmidique est introduit dans une cuve d'électroporation de 2mm (*Eurogentec®*). Les paramètres d'électrolocation sont un voltage de 1,5kV.cm<sup>-1</sup>, une capacitance de 25 F et une résistance de 24Ω.

Les parasites transfectés sont mis en culture dans une boîte contenant des cellules confluentes.

### **1. Sélection des parasites :**

Après la lyse des parasites transfectés, ils sont transférés dans une nouvelle boîte dans laquelle est ajoutée préalablement une drogue permettant la sélection des transfectants. Pour les plasmides contenant le gène de résistance DHFR, la pyriméthamine est ajoutée à la concentration de 2  $\mu$ M. Pour les plasmides contenant le gène de résistance HXGPRT, l'acide mycophénolique et la xanthine sont ajoutés à la concentration de 25  $\mu$ g/mL. Les parasites sont ensuite clonés par dilution limite et les clones positifs testés par Immunofluorescence.

### **2. Immunofluorescence indirecte sur les parasites intracellulaires :**

Les parasites sont mis en présence de cellules HFF confluentes sur des lamelles de verre en plaque 24 puits. Après 24 heures d'incubation les parasites intracellulaires sont fixés avec de la paraformaldehyde (PFA) à 4% pendant 15-30 min à température ambiante. Les lamelles sont ensuite lavées avec du PBS et soumises à une étape de saturation et perméabilisation dans une solution de PBS contenant du Triton X100 0.2%, en présence de 3% de SVF et 0,2M de glycine pendant 15 min. Les anticorps primaire (tableau 2) sont dilués et incubés en PBS, Triton X100 0,2% et SVF 3% pendant 60 minutes à température ambiante. Trois lavages sont réalisés par la suite avec du PBS et les anticorps secondaires fluorescents sont ajoutés et incubés pendant 60 minutes en présence du DAPI dilué au 1000<sup>ème</sup> (marqueur du noyau).

Dans ce travail, plusieurs anticorps de souris, de rat ou de lapin ont été utilisés. Ces anticorps sont couplés à l'Alexa Fluor 594(fluoresce en rouge), à l'Alexa Fluor 488(fluoresce en vert) (8  $\mu$ g/ml, *Invitrogen*®).

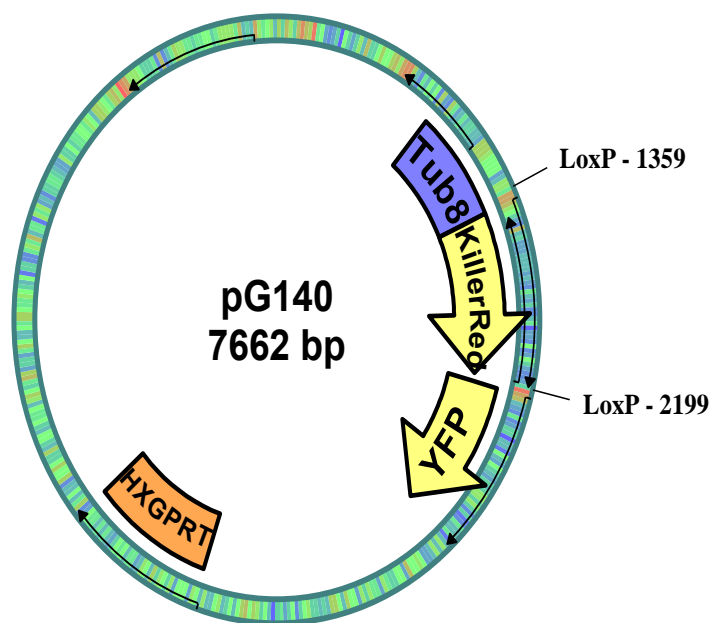
Les lamelles sont ensuite lavées avec du PBS, montées sur lame en verre et observées par microscopie à Epifluorescence

## **BIOLOGIE MOLECULAIRE**

### **1. Clonage dans le vecteur Pg140 pour la réalisation d'un knockout inducible**

Le plasmide pG140 (Figure 10, page 12 bis) a été utilisé pour la production d'un knockout du gène AP2X-5 qui est inséré entre deux séquences de loxp.

Amplification des inserts :



**Figure 10 : Carte physique du plasmide pG140.**



	AC Primaire	AC Secondaire
AP2X-5 HA	anti lapin (1/400)	anti lapin 488 (1/1000)
AP2X-5 HA (cycle cellulaire)	anti IMC souris+ anti HA lapin (1/200) (1/500)	anti lapin 488 + anti souris 594 (1/1000)
anti MORNI lapin+ anti HA rat (1/500) (1/200)	anti rat 488 + anti lapin 594 (1/1000)	
Anti centrin+ anti HA rat (1/400) (1/200)	anti rat 595+ anti HA rat 488 (1/1000)	
AP2X-5 HA-TAP	anti lapin +anti AP2X-5 (1/2000)+ (1/2000)	anti lapin 488 + anti souris 594 (1/1000)

**Tableau 2: Anticorps utilisés pour Immunofluorescence indirecte sur les parasites intracellulaires.** Les anticorps sont couplés à l’Alexa Fluor 594(fluoresce en rouge), à l’Alexa Fluor 488(fluoresce en vert) (8 µg/ml, *Invitrogen*®).

Le gène AP2X-5 a été séparé en 5 fragments (séquences annexe 1) puis synthétisé. L'assemblage a été réalisé grâce au kit Gibson Assembly® Cloning Kit. L'amplification de l'insert est réalisée par PCR avec un couple d'amorces oligonucléotidiques sens (TAACCAAGATCCACTTGACCATGGCGACTTTCCAAATC) et anti sens (TGCTATACGAAGTTATTAATTAAGGACCAAAACGAGGAAGCG) dans lesquels on a ajouté les sites de restrictions *PacI*/*AvrII*, permettant de cloner le fragment d'ADN d'intérêt dans le plasmide pG140. Le mélange de PCR comprend une enzyme *Platinum*® haute-fidélité (évite les mutations lors de l'amplification), 100-200ng de l'assemblage est utilisé comme matrice, 5µl du tampon de réaction fourni, des dNTP (0.2mM) et 1 unité d'enzyme pour un volume final de PCR de 50 µL.

Les conditions de PCR sont les suivantes :

94°C pendant 2 minutes (dénaturation initiale) 94°C pendant 30 secondes (dénaturation) 60°C pendant 30 secondes (hybridation) 68°C pendant 6 minutes et 30 secondes (élongation) 68°C pendant 10 minutes (élongation finale), 35 Cycle. Après la PCR, 1/10 du produit de PCR est déposé sur gel d'agarose 1% pour vérifier la taille du fragment amplifié. Les 9/10 qui restent sont purifiés grâce au kit de purification d'ADN NucleospinExtract II (*Macherey-Nagel*®).

Transformation des bactéries thermocompétentes TOP10 :

Cinq µL du produit de ligation (plasmide + insert) est incubé avec 50 µL de bactéries TOP10F' compétentes, 45 secondes à 37°C puis 2 minutes dans la glace (choc thermique). Du milieu (250µL) LB (Luria-Bertani, Tryptone 1%, extrait de levure 0,5%, NaCl 1%) est ajouté et les bactéries sont incubées une heure à 37°C (pour développer la résistance des bactéries à l'ampicilline). Les bactéries sont ensuite centrifugées 2 minutes à 4200 rpm, 150 µL est éliminé et le reste étalé sur un milieu sélectif, LB agar complémenté en ampicilline, et incubé à 37°C sur la nuit.

Criblage par PCR sur colonie :

Une PCR sur colonie est réalisée sur les colonies formées sur boîte de Pétri afin de vérifier la présence des inserts. Avec un cône, les colonies résistantes à l'ampicilline sont repiquées sur le même milieu de sélection. Le même cône est ensuite placé dans un tube contenant le mélange réactif pour la PCR contenant 0,1 µL *DreamTaq*™ DNA Polymerase (*Fermentas*®), 2,5 µL de 10X *DreamTaq*™ Green

Buffer, 0,2 mM de dNTP et 1mM de chaque amorce, ensuite le mélange est complété avec de l'eau milli Q jusqu'à 25 µL.

Les conditions de PCR sont les suivantes :

95°C pendant 5 minutes (dénaturation initiale), 95°C pendant 30 secondes (dénaturation), 58°C pendant 30 secondes (hybridation), 72°C pendant 6 minutes et 30 secondes (élongation), 72°C pendant 10 minutes (élongation finale), 24 cycles.

Les produits de la PCR sur colonie sont déposés sur gel d'agarose pour détecter les clones positifs.

Chaque clone positif est repiqué dans LB liquide complété d'ampicilline et incubé à 37°C sur la nuit. Le lendemain une partie de la culture est conservée à -20°C dans 25% de glycérol final et le reste soumis à l'extraction de plasmides avec le kit NucleospinPlasmid (*Macherey-Nagel*®). Les plasmides extraits sont digérés avec les enzymes *PacI*/*AvrII* pour vérifier la présence de l'insert AP2X-5.

**1. Clonages dans le vecteur *pLIC-HA* et *pLIC-TAP* de l'insert AP2X-5 pour les stratégies de « remplacement allélique ou Knock-In » : Figure 11, page 14 bis**

Les clonages ont été réalisés grâce à la technique du LIC (Clonage Indépendant de la Ligation) qui ne nécessite pas l'utilisation de la ligase. Un traitement du plasmide LIC et de l'insert par une T4 DNA polymérase génère des bouts cohésifs qui seront hybridés par la bactérie. Les fragments d'ADN contenant une partie de la séquence d'AP2X-5 est amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique, avec l'enzyme *Platinum*® haute-fidélité (dans les mêmes conditions de PCR que précédemment). Les oligonucléotides sens (TACTTCCAATCCAATTTAATGCGCCGAGATCCTGAGTTTCAA) et anti-sens (TCCTCCACTTCCAATTTTAGCGGACCAAAACGAGGAAGCGA) ont permis d'amplifier le fragment d'ADN génomique contenant la séquence. Le fragment amplifié est ensuite traité avec l'enzyme T4 DNA polymérase qui va générer des bouts cohésifs compatibles avec ceux du plasmide (le mélange réactif contient : 5mM DTT, 4mM dCTP, 2,5 U d'enzyme, 0,2pmol d'insert, pour un volume final de 20µl). Le plasmide *pLIC* (2 µg) contenant l'étiquette HA ou TAP est ensuite linéarisé par l'enzyme *PacI* et traité avec l'enzyme T4 DNA Polymerase (*Fermentas*®) avec environ 7,5 U d'enzyme pour 1,5 ng d'ADN, 5mM DTT, 4mM dGTP (volume final 60

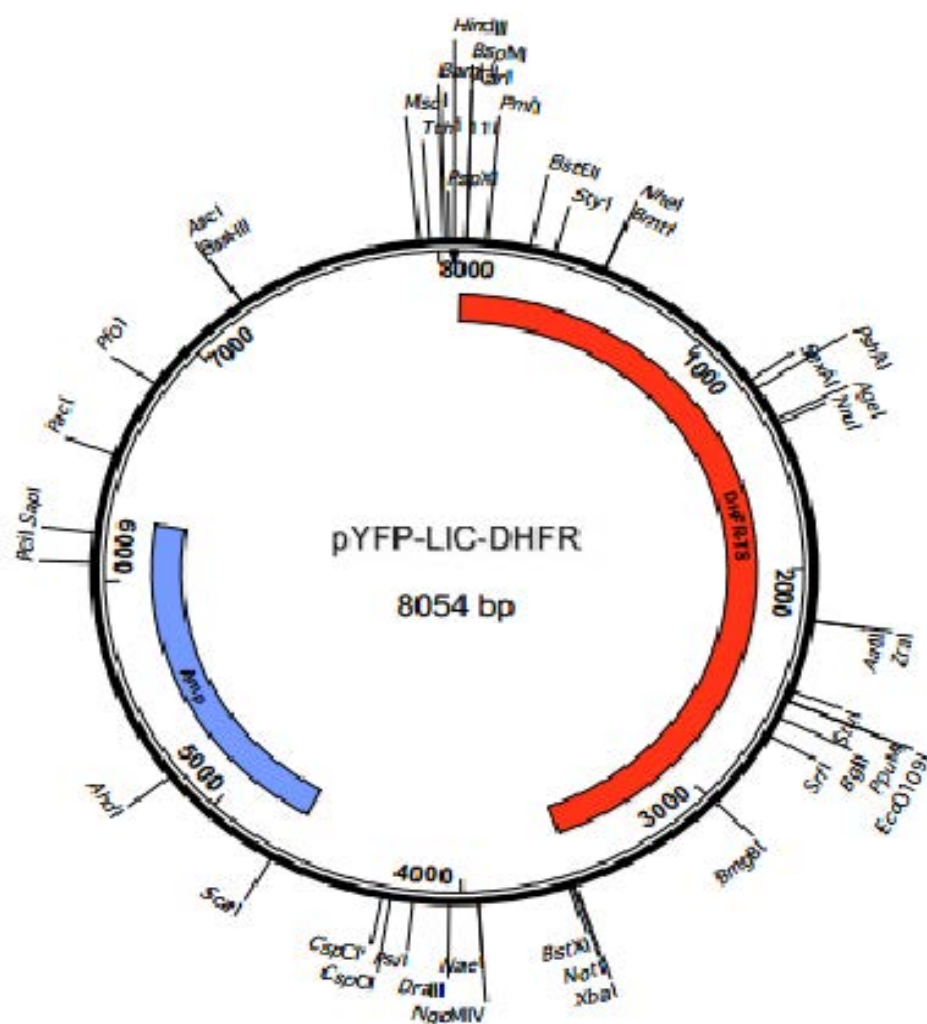


Figure 11: Carte physique du pLIC HA

μl). La T4 DNA polymérase est activée à 22°C pendant 30 minutes puis inactivée à 70°C pendant 20 minutes.

Un μL de plasmide pLIC est 2μL d'insert traités sont ensuite incubés 10 minutes à température ambiante. L'interaction plasmide-insert est ensuite arrêtée par l'ajout de 1μl d'EDTA (25 mM) pendant 5 minutes. Un μL du mélange est transformé dans les bactéries compétentes TOP10F' et les clones positifs criblés par PCR sur colonies.

Avant la transfection, les plasmides extraits issus des clones positifs sont linéarisés avec l'enzyme EcoRV afin de permettre leur insertion dans le locus endogène du gène sauvage (dans le génome parasite).

#### **IV. Biochimie :**

##### **1. Purification des protéines :**

Des cellules confluentes sont infectées avec la souche AP2X-5 HA-TAP de *T. gondii*. Après quatre jours, les parasites intracellulaires, sont purifiés et lavé une fois avec du PBS froid . Les parasites sont lysés avec le tampon de lyse NEB1 (10 Mm Hepes pH 7,9 ; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> ; 10 mM KCl ; 0,5 mM DTT ; 0,1 mM EDTA ; 0,65% NP40 ; 0,5mM PMSF) à froid. L'extrait cytoplasmique a été éliminé par centrifugation 5 min à vitesse maximale à 4°C. L'extrait nucléaire est resuspendu dans l'ipp150 ( 10mM Tris pH8, 150 Mm NaCl, 0.1 % NP40, PMSF) auquel on ajoute des billes IgG et incubé 2h.

Après centrifugation pendant 3 min à 3000 rpm le surnageant après IgG est conservé. Le culot est lavé quatre fois avec 10 ml de l'ipp150. Les échantillons sont élués avec 50 u de TEV pour un volume final de 200μl.

##### **2. Précipitation des protéines :**

Les protéines sont fixées avec une solution de Sodium Deoxycholate 5 mg/ml. Pour précipiter les protéines, 10% de TCA sont utilisées. Après incubation 10 min sur glace la solution est centrifugée 3 min à 3000 rpm, le surnageant est éliminé et le culot est séché pendant 30 min à température ambiante, pour être ensuite resuspendu dans du PBS 1%.

##### **3. Immuno-empreinte (Western blot) :**

###### **a) Électrophorèse en gel d'acrylamide :**

L'électrophorèse se fait en conditions dénaturantes selon la méthode de Laemmli.

Le gel de polyacrylamide comprend un gel inférieur (séparation) qui contient 10% d'acrylamide (acrylamide/bisacrylamide, 29/1), du tampon Tris-HCl 375 mM pH 8,8, du SDS 0,01%, du Persulfate d'Ammonium (APS) 0,5% et du Temed 0,05%) et un gel supérieur (concentration) composé de 5% d'acrylamide (acrylamide/bisacrylamide, 29/1, Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,01%, APS 0,75%, Temed 0,075%), coulé au-dessus le gel de séparation.

Le tout est coulé entre une plaque en verre et une plaque en alumine puis monté sur le système Mighty Small SE250 (*Hoefler*®).

Les protéines parasitaires sont reprises dans du tampon de reprise, Laemmli [Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 ; SDS 2% (p/v) ; saccharose 10% (p/v) ; bleu de bromophénol 0,2% (p/v)] supplémenté de DTT (DiThioThréitol) à 0,1 M de concentration finale. Avant les dépôts dans le gel d'acrylamide, les échantillons protéiques et le marqueur de poids moléculaire sont chauffés pendant 5 min à 100°C, puis centrifugés pendant 5 min à 13000 g. Les échantillons sont ensuite déposés sur gel. La migration se déroule à 30 mA dans un tampon de migration (25 mM Tris-HCl pH 8,3, SDS 0,1%, 192 mM glycine).

#### **b) *Electrotransfert* :**

Les protéines du gel d'électrophorèse sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,2 µm (*Hybond*, *Amersham Biosciences*®). Le gel est placé sur la membrane de nitrocellulose et inséré entre deux feuilles de papier *whatman*® imprégné au préalable du tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM, glycine 190 mM, éthanol 20%, pH 8,3-8,5). Le transfert est réalisé dans le même tampon à un voltage de 30 V sur la nuit.

#### **c) *Détection des protéines* :**

La membrane de nitrocellulose est saturée avec du TNT (Tris-HCl 15 mM pH 8, NaCl 140 mM, Tween-20 0,05%) contenant 5% de lait écrémé (*Regilait*™), pendant 30 minutes. Les anticorps primaires (tableau 2) sont dilués dans du TNT supplémenté de 5% de lait et sont incubés sur la membrane sur la nuit. Après trois lavages de 10 minutes au TNT, l'anticorps secondaire (tableau 2) est incubé pendant une heure. Après trois lavages de 10 min, une solution de révélation par chimioluminescence (*ECL*®) est déposée sur la membrane pendant 5 minutes. La révélation se fait sur film photographique pendant différents temps de contact.

#### **4. ChIP (*Immunoprécipitation de la chromatine des parasites intracellulaire*)**

Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) est une méthode pour l'étude des interactions entre les protéines spécifiques ou des formes modifiées de protéines et une région d'ADN génomique. Les parasites sont récupérés après 24 h d'infection et fixés dans du PBS complété avec 1% de Formaldéhyde 15min à température ambiante. Après la fixation, les parasites sont purifiés et repris dans un tampon de lyse (10mM Tris-HCl pH8, 10mM EDTA, 1% SDS, inhibiteur de protéases) avant la sonication d'ADN en utilisant le dispositif de Bioruptor pendant 50 min à 4 ° C avec une séquence de 30 secondes de sonication et 30 secondes de repos. Après centrifugation le surnageant est dilué avec 1ml de tampon de dilution (0,01 % SDS, 1% Triton, 10 mM Tris pH8, 16.7 mM NaCl, PMSF). Une partie de l'échantillon (300 µL) est réservé et le reste des complexes protéine-ADN est précipité sur la nuit avec des billes IgG. Les billes sont lavées deux fois avec un tampon de lavage (100 mM Tris, 250 mM NaCl, 1% NP40, 1% d'acide deoxycholique, PMSF), puis éluées 2 fois (élutions de 75 µl) dans un tampon d'élution (50 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1% SDS) 10 min sous agitation à température ambiante. La séparation du complexe ADN-protéine se fait à 67°C pendant 4h. L'ADN est ensuite purifié grâce au kit de purification d'ADN NucleospinExtract II (Macherey-Nagel®).

#### ***PCR quantitative***

Toutes les amorces ont été conçues à l'aide en ligne Primer2 v.0.4.0 et sont énumérées dans Annexe 2. La PCR quantitative a été effectuée sur un système Mx3000P (Agilent Technologies). Les réactions individuelles ont été préparées avec 0,5 µM de chaque amorce, 30 ng d'ADN d'entrée, et SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA) dans un volume final de 20 µl. Toutes les expériences étaient effectuées deux fois.

## Résultats



## ***I. Interaction de AP2X-5 avec AP2XI-5***

Des résultats de co-immunoprécipitation ont montrés une interaction potentielle entre AP2XI-5 et AP2X-5. Cependant l'interaction entre ces deux facteurs de transcription n'a jamais été confirmée par une immunoprécipitation des partenaires de la protéine AP2X-5.

Le but de cette expérience est donc de confirmer cette interaction entre ces deux facteurs de transcription.

Premièrement, nous avons commencé par effectuer des remplacements alléliques (knock-in), où la copie endogène du gène est remplacée par une copie étiquetée avec une étiquette TAP.

Les clonages ont été réalisés grâce à la technique du LIC (Clonage Indépendant de la Ligation) qui ne nécessite pas l'utilisation de la ligase.

Un traitement du plasmide LIC et de l'insert par une T4 DNA polymérase génère des bouts cohésifs qui seront ligués dans la bactérie. Le plasmide ainsi obtenu est ensuite linéarisé par l'enzyme EcoRV et introduit dans le génome du parasite sauvage.

La sélection par une drogue (acide mycophénolique - xhantine) permet de sélectionner les parasites qui ont intégré le plasmide contenant le gène d'intérêt.

Les clones de parasites positifs sont vérifiés par fluorescence avec un anticorps anti-HA contenu en plus de l'étiquette TAP. (Figure 12 A, page 18 BIS)

Deuxièmement, les parasites AP2X-5 HA-TAP ont produits en grande quantité afin de réaliser une immunoprécipitation de ces protéines grâce à l'étiquette TAP, suivie d'une immuno-empreinte (Western blot) révélé avec des anticorps anti-HA dirigés contre la protéine étiquetée AP2X-5 et des anticorps anti-AP2XI-5.

L'étiquette TAP utilisée lors de cette Immunoprécipitation est constituée d'une protéine A possédant une forte affinité pour les anti-corps IgG et d'un domaine protéolytique.

La technique du TAP consiste en l'Immunoprécipitation de la protéine étiquetée *via* des billes IgG qui reconnaissent la protéine A de l'étiquette TAP, suivi d'un clivage par une protéase (TEV) au niveau du site protéolytique afin de libérer la protéine purifiée.

Les résultats sont présentés dans la figure (12 B, page 19 BIS). Nous avons pu observer la présence de deux bandes correspondant aux tailles attendues d'AP2X-5 (215 kDa) et AP2XI-5 (90 kDa) dans l'échantillon élué par la protéase TEV. L'intensité faible des bandes dans l'échantillon avant immunoprécipitation (input) révèle leur faible quantité dans l'échantillon avant la procédure. Leur présence simultanée dans l'échantillon élué par la protéase TEV suggère que ces protéines interagissent ensemble.

## **II. Expression de AP2X-5 et suivie du cycle cellulaire :**

La virulence de *T. gondii* est principalement le résultat d'une expansion incontrôlée de la biomasse parasite provoquant une inflammation et la destruction des tissus.

Les tachyzoïtes de *T. gondii* se divisent par endodyogenèse. Leur cycle cellulaire est caractérisé par uniquement 3 phases G1, S, M sans perte de la membrane nucléaire.

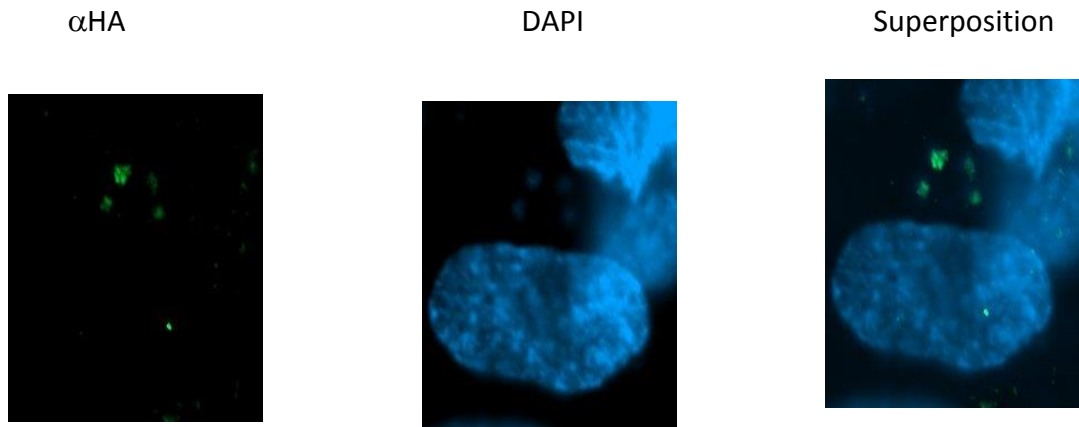
Le but de cette partie du travail est de suivre le cycle cellulaire du parasite et d'identifier à quel moment AP2X-5 est exprimé. Pour réaliser cette expérience nous avons utilisé une souche exprimant la protéine AP2X-5 avec une étiquette HA, construite avec la technique du LIC comme cité auparavant. .

Les parasites sont ensuite clonés par dilution limite et testés par Immunofluorescence avec l'anti corps anti-HA, et l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488 (vert) et le DAPI pour marquer le noyau.

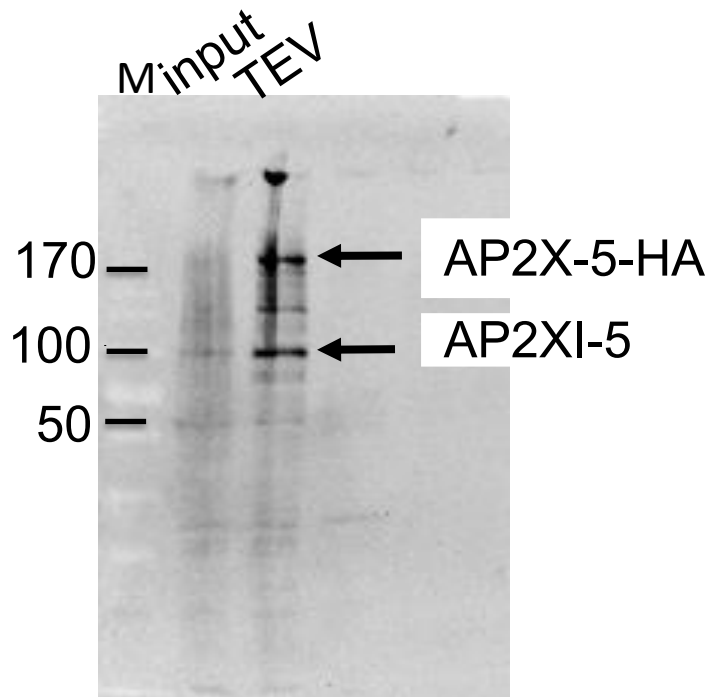
Comme le montre la figure (13.A, page 21 BIS) on est bien en présence de parasites positifs pour l'étiquette HA (en vert). Nous observons aussi que le signal est présent au niveau du noyau comme représenté dans la figure lors de la superposition avec un marqueur de l'ADN (DAPI, en bleu). Ce clone exprime donc bien la protéine AP2X-5 avec une étiquette HA.

Ce clone a été utilisé pour suivre l'expression de la protéine AP2X-5. Des cellules hôtes ont été infectées par les parasites AP2X-5, ensuite fixées et traitées pour l'immunofluorescence 24 h plus tard. La croissance et le cycle cellulaire des parasites n'étant pas synchronisée, nous observons dans la population des parasites marqués par la présence de l'étiquette HA et d'autres vacuoles ne

A



B



**Figure 12: Interaction de AP2X-5 avec AP2XI-5.**

**A. immunofluorescence de la souche AP2X-5 HA-TAP:** la souche est obtenue grâce a un remplacement allélique du gène grâce à la technique du LIC. **B: Western blot:** une immunoprécipitation de ces protéines grâce à l'étiquette TAP, suivie d'une immuno-empreinte (Western blot) révélé avec les anticorps anti-HA et anti AP2XI-5. M: marqueur de poids moléculaire (Kda).

présentant pas de marquage. Ceci indique que la protéine AP2X-5 n'est pas exprimée à tout moment du cycle cellulaire. Afin de déterminer le moment du cycle lors duquel AP2X-5 est exprimé, nous avons réalisé des co-marquages avec des anticorps reconnaissant des marqueurs du cycle cellulaire.

Le premier anti-corps utilisé reconnaît la protéine IMC1 qui est présente dans le complexe membranaire interne. Ce complexe bourgeonne dans la cellule mère au moment de l'apparition des cellules filles (fin de phase M). Il nous permettra de voir l'apparition des structures spécifiques aux cellules filles. Ces structures des cellules filles contenant cette protéine se forment à l'intérieur de la cellule mère.

Les résultats du marquage avec l'anticorps anti-IMC 1 est présenté par la figure (13 B et C, page 21 BIS)

Pour la figure 13 B on observe bien IMC 1 marqué en rouge indiquant la membrane interne du parasite. La largeur du parasite comme indiqué par le marquage IMC1 et la présence d'un seul noyau coloré en bleu par le DAPI dans cette vacuole, indique que ce parasite est dans la phase S du cycle cellulaire. Nous avons ensuite vérifié la présence du signal HA (vert). Nous observons un signal positif se situant au niveau du noyau.

La deuxième figure (13 C) représente la fin de la phase M du cycle. On distingue le bourgeonnement des membranes à l'intérieur du parasite mère (en rouge) et la séparation de deux noyaux des cellules filles. Nous n'observons pas de signal avec l'anticorps anti-HA, indiquant l'absence de détection de l'expression de la protéine AP2X-5.

Ces résultats montrent qu'AP2X-5 est bien exprimé lors de la phase S, mais que son expression n'est pas détectable quand le parasite arrive à la cytokinèse (fin de phase M).

Le second anti-corps utilisé est MORN1 qui se développe sous la forme d'un disque plat, correspondant au début de Complexe basal et permet aussi de suivre l'entrée en phase S et la phase M.

Dans la figure 13.D : on distingue le début de la formation du disque MORN1 coloré en rouge (un point rouge) et la présence d'un seul noyau (en bleu). Cette description correspond à un parasite en phase G1. Dans cette figure aucun

marquage vert n'est visible. AP2X-5 ne serait donc pas exprimé à cette phase du cycle cellulaire.

Contrairement à la figure précédente, dans la figure (13 E) on peut observer le début de la séparation du MORN1 (deux points) en rouge et en même temps une séparation du noyau ce qui signifie que le parasite se trouve entre la phase S et le début de la phase M. On peut aussi observer un signal HA au niveau du noyau. Ces résultats montrent que AP2X-5 est exprimé entre la fin de la phase S et le début de la phase M.

### **III. Analyse d'immunoprecipitation de chromatine (CHIP) :Figure 14**

Le but de cette partie du travail est de réaliser une expérience de ChIP pour identifier les régions chromosomiques où le facteur AP2X-5 se lie à l'ADN chez *T. gondii*. L'expérience a été réalisée avec la même souche AP2X-5 HA-TAP, plus une souche contrôle non étiquetée (sauvage).

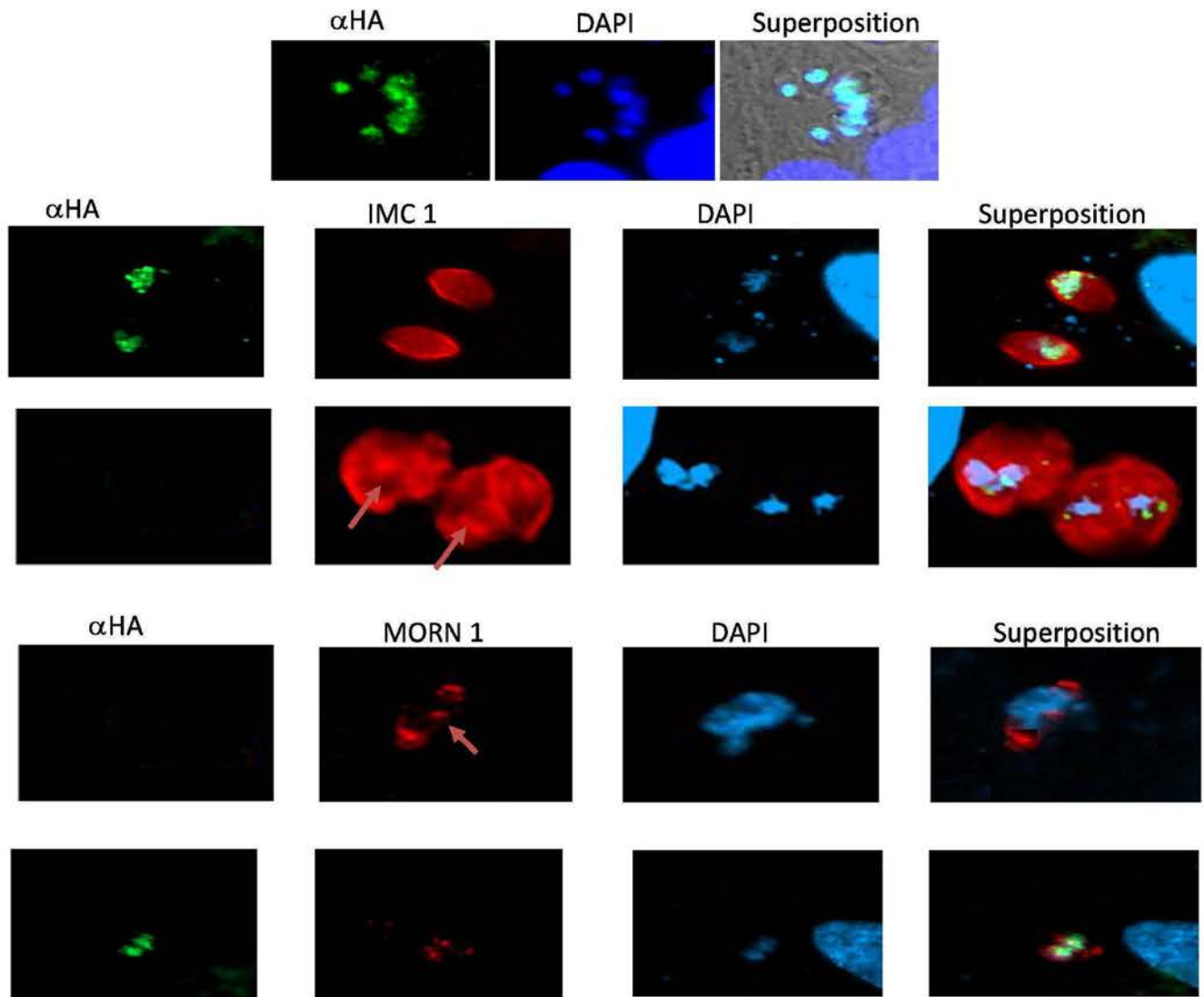
Dans un premier temps les parasites sauvages et étiquetés ont été cultivés par l'infection des cellules HFF avec  $30.10^6$  pour les deux souches, après 24 H les parasites intracellulaires vont servir pour la réalisation de l'analyse.

Le principe de l'immunoprecipitation de chromatine est de créer un pont physique entre les protéines et l'ADN grâce à la formaldéhyde, pour conserver toute interaction ADN-protéines.

Les échantillons sont ensuite lavés et lysés, avant le fractionnement de la chromatine par sonication. L'immunoprécipitation de la chromatine fractionnée a été effectuée pendant une nuit à 4 ° C par addition d'un tampon de dilution, et des billes magnétiques IgG.

L'ADN est purifié et ensuite soumis à une amplification par PCR quantitative en temps réel, en utilisant 5 couples d'amorces représentant les promoteurs des gènes suivants : ROP 5, ROP 16, ROP 18 et AP2XI-5. Un promoteur contrôle (neg) sur lequel AP2X-5 ne se fixe pas est aussi inclus dans l'analyse.

Nous comparons ensuite l'enrichissement de chaque séquence dans l'échantillon élué par rapport à l'échantillon avant immunoprécipitation et cela pour deux souches. L'enrichissement d'une séquence promotrice sera jugé Significatif lorsqu'il dépasse celui de la séquence contrôle (neg) et qu'il est plus important dans la souche étiquetée que dans la souche sauvage.



**Figure 13: Expression de AP2X-5 et suivi du cycle cellulaire**

**A. . immunofluorescence de la souche AP2X-5 HA:** la souche est obtenue grâce à un remplacement allélique du gène grâce à la technique du LIC. **B et C marquage avec IMC 1 :** (rouge) il est spécifique au complexe membranaire interne du parasite. La flèche pointe vers les structures en formation des cellules filles. **D ET E marquage avec MORN1:** correspondant au début de formation du Complexe basal. La flèche pointe vers la formation du centrocone.

Les résultats présentés dans la figure (14 ,page 22 BIS indiquent qu'il y a un enrichissement au niveau des promoteurs des gènes codant pour les protéines de rhoptrie ROP 18 et ROP 5, ainsi que pour le promoteur du gène AP2XI-5. Cependant, nous ne pouvons pas arriver à la même conclusion pour le promoteur du gène ROP 16 car l'enrichissement est au même niveau dans la souche étiquetée et dans la souche sauvage.

Ces résultats indiquent que probablement la protéine AP2X-5 interagit avec les promoteurs des gènes ROP 18, AP2XI-5 et ROP 5.

#### ***IV. Clonage dans le vecteur Pg140 pour la réalisation d'un knockout inductible (figure 15, page 22 ter)***

Il s'agissait ici d'avoir une construction permettant de déterminer le rôle d'AP2X-5, vis-à-vis de la virulence de *T.gondii* par la réalisation d'un KO inductible.

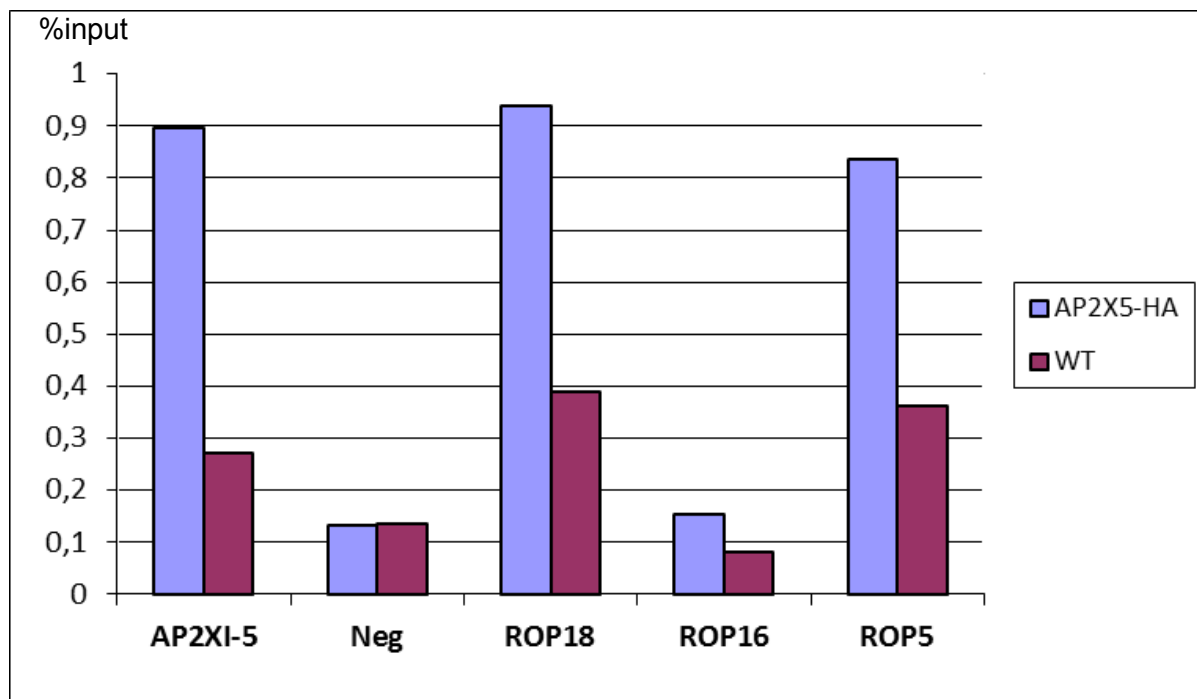
Le principe est de remplacer le gène endogène par une copie du gène flanquée de séquences LoxP. L'activité de la recombinaise Cre qui a la capacité de reconnaître les motifs LoxP permettra d'exciser le gène au locus endogène.

Afin de réaliser cette construction notre choix s'est porté sur le vecteur pG140 qui permet d'apporter de réaliser une double recombinaison homologe en remplaçant le gène endogène par une copie cDNA du gène flanquée des séquences LoxP.

Dans un premier temps nous avons tenté d'amplifier le gène entier, ce qui n'était pas possible, pour remédier à ce problème, le gène a été divisé en quatre fragments, puis synthétisé. Chaque fragment a été amplifié séparément et purifié.

Par la suite Les quatre fragments ont été rassemblés à l'aide du kit Gibson Assembly® Cloning, et amplifiés par PCR comme le montre la figure 15 A (un fragment de 5919 Kb), enfin le vecteur et l'insert ont été digérés par PacI/AvrII avant la ligation.

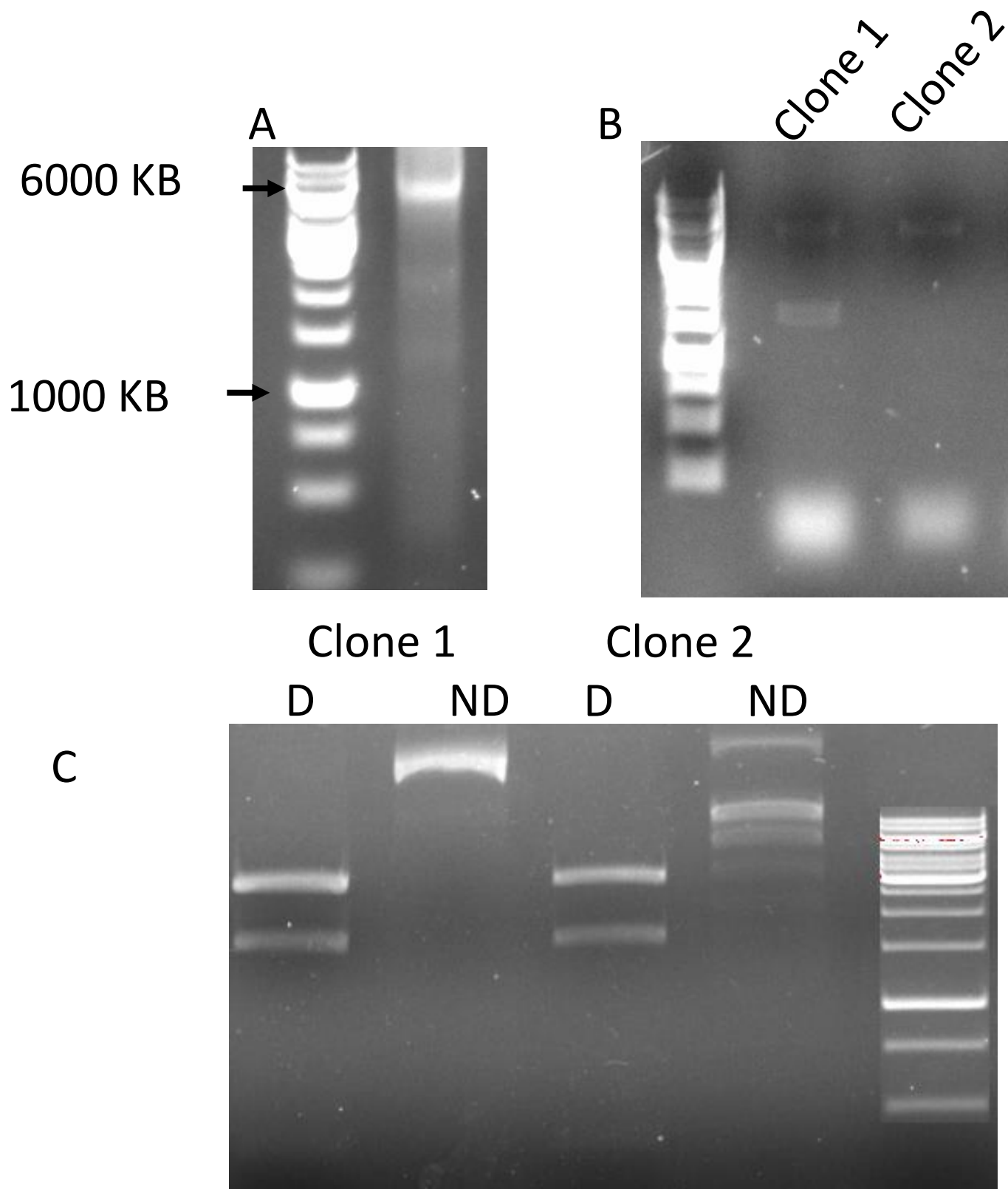
Une PCR sur colonie est réalisée sur les colonies formées sur boîte de Pétri afin de vérifier la présence des inserts.



**Figure 14 : Analyse d'immunoprecipitation de chromatine.**

Les parasites sauvages et étiquetés ont été cultivés par l'infection des cellules HFF. Après le CHIP, l'ADN récupéré est purifié et ensuite soumis à une amplification par PCR quantitative en temps réel, en utilisant cinq couples d'amorces ROP 5, ROP 16, ROP 18, AP2XI-5, et un négatif (neg) sur lequel AP2XI-5 ne se fixe pas comme contrôle





**Figure 15: profil électrophorétique du clonage de AP2X-5.**

**A. Amplification du gène AP2X-5 :** le gène a été coupé en quatre fragments, assemblé, et amplifié par PCR. Le gène entier fait 5916 Kb. **B. Clones positifs :** le gène a été cloné dans le vecteur Pg410 , et introduit dans la bacterie Top 10 après transformation. L'insert a été amplifié pour vérifier son intégration dans le vecteur. **C. Profils de restriction des clones positifs par PCR:** les deux clones sont extraits puis digérés par l'enzyme BglII et les fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 %.

Lors de nos transformations, soit on obtenait aucune colonie ou un faible nombre comparé au témoin. De manière surprenante, et après plusieurs tentatives seul deux clones présentent un profil positif lors de la PCR a été obtenus (figure 15 B).

Les plasmides extraits de ces clones ont été digérés par l'enzyme de restriction BglII, et les fragments de restriction ont alors été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %.

Les profils électrophorétiques obtenus, présentés sur la figure 15 C, sont apparus difficilement interprétables dans la mesure où ils ne correspondaient pas au profils attendus de deux fragments de 5441 Kb et 8103 kb.

D'autres tentatives pour réaliser cette construction ont été effectuées mais malheureusement elles ont toutes échouées. Cela peut être dû soit à un problème de ligation entre le vecteur et l'insert du notamment à la taille de l'insert (6 kb) par rapport au plasmide (10kb).

## Discussion

Des études récentes ont identifiés des facteurs de transcriptions à domaine AP2 dans le génome des Apicomplexa, qui ont la capacité de se lier à l'ADN. De nombreuses études ont été réalisées pour comprendre le rôle de ces AP2.

Chez *T. gondii*, ces facteurs sont au nombre de 60. Parmi ces facteurs de transcription putatifs, AP2XI-5 a été identifié comme étant capable de se lier aux promoteurs de nombreux gènes transcrits au stade S et M du cycle cellulaire (GISSOT et *al.*, 2013. Behnke et *al.*, 2010). De nombreux gènes codant pour des protéines de rhoptries et de micronèmes sont potentiellement régulés par AP2XI-5. Afin de mieux comprendre son mode d'action, une étude protéomique a permis d'identifier certains partenaires putatifs de cette protéine. Parmi ces partenaires AP2X-5.

Dans ce travail nous proposons de poursuivre ces études pour identifier le rôle d'AP2X-5.

### ***Interaction entre AP2XI-5 et AP2X-5 :***

Nous avons commencé par apporter une réponse à l'éventuelle interaction entre AP2X-5 et le facteur de transcription AP2XI-5 grâce à l'analyse de l'immuno-précipitation d'AP2X-5 suivie d'un Western blot avec des anticorps anti-HA (reconnaissant AP2X-5) et des anticorps anti-AP2XI-5.

Nous avons observé la présence de deux bandes correspondant aux deux protéines dans l'échantillon élué par la protéase TEV. Ceci indique que ces protéines interagissent.

Comme analyse complémentaire nous devons réaliser une immuno-précipitation des protéines provenant d'un parasite sauvage non-étiqueté afin de s'assurer que la présence d'AP2XI-5 n'est pas due au hasard. Cependant, ce contrôle a déjà été réalisé par d'autres personnes au laboratoire et n'a pas montré de contamination de la protéine AP2XI-5 dans l'échantillon sauvage.

Il serait intéressant aussi de découvrir quelle partie de ces deux protéines est responsable de cette interaction. Pour cela, la production d'une protéine recombinante représentant AP2X-5 serait utile. Différents mutants de cette protéine pourraient alors être réalisés et testés pour leur interaction avec AP2XI-5 issu d'extraits nucléaires.

On peut aussi utiliser la même technique d'immunoprécipitation d'AP2X-5 mais suivie par une chromatographie d'affinité et d'une analyse en spectrométrie de masse, qui permettra d'identifier les interactions entre les protéines à grande échelle. Cette technique a été récemment utilisée pour avoir des informations sur les interactions de la protéine *TgSsossB* avec le complexe protéique *TgAlba* (*TgAlba1/TgAlba2*) (GISSOT et al, 2013).

### ***AP2X-5 se fixe sur des promoteurs de gènes de virulence***

Nous avons aussi identifié grâce à l'immunoprécipitation de la chromatine les régions chromosomiques où AP2X-5 se fixe. Nos résultats montrent un enrichissement au niveau des promoteurs des gènes codant les protéines ROP5, ROP18 et enfin le promoteur AP2XI-5.

Ces promoteurs ont été sélectionnés car la protéine AP2XI-5 est capable de se lier spécifiquement à ces régions. Ces données suggèrent qu'AP2XI-5 et AP2X-5 agissent en coordination pour réguler ces promoteurs. Afin d'identifier d'autres régions cible d'AP2X-5, nous souhaitons réaliser une ChIP suivie d'une identification des séquences immunoprécipitées par séquençage haut-débit. Ces expériences pourront confirmer le rôle de cette protéine dans les mécanismes de régulation des gènes de virulence.

### ***Expression d'AP2X-5 pendant le cycle cellulaire :***

Parallèlement aux analyses précédentes, on a voulu identifier à quel moment du cycle cellulaire de *T.gondii* AP2X-5 est exprimé.

Grâce à des marqueurs tels qu'IMC1, MORN1 on a pu suivre son expression. Cette analyse nous a indiqué qu'il est exprimé entre le début de la phase S et le début de la phase M. Cette analyse doit être complétée avec d'autres marqueurs du cycle cellulaire, afin de mieux cerner le moment précis d'expression d'AP2X-5.

### ***Rôle biologique d'AP2X-5:***

Afin d'identifier le rôle de cette protéine dans le cycle cellulaire et l'expression des gènes de virulence, on a essayé de réaliser une construction permettant la modification du locus endogène du parasite. Cette technique permet l'excision du génome de la séquence d'intérêt flanquée de séquences LoxP après ajout d'une

drogue activant la Cre recombinase. Ce KO inducible pourrait donc permettre d'étudier le rôle de cette protéine dans le cas où celui-ci serait essentiel à la survie du parasite. Toutes nos tentatives pour réaliser cette construction ont pour l'instant échouées. La taille du gène (6kb) que nous tentons d'insérer dans le vecteur (10 kb) pourrait être en cause. Nous pourrions donc tenter de cloner une partie du gène ou bien le cloner dans le vecteur en plusieurs parties grâce à l'ajout de site de restriction spécifiques.

Dans le cas où nous pourrions réaliser cette construction, nous envisageons de tester les phénotypes des mutants obtenus.

Des immunofluorescences avec des anticorps spécifiques au cycle cellulaire permettraient d'observer l'impact de cette délétion sur le parasite.

Un test de plaque de lyse déterminera la viabilité du parasite, sa capacité à se multiplier, à lyser, et à envahir d'autres cellules.

Afin de comparer le niveau de virulence des souches sauvage et mutante celles-ci pourront être injectées à des souris

### ***Etudes in vitro d'AP2X-5:***

Nous pouvons aussi envisager de produire et d'analyser une protéine recombinante contenant ce domaine AP2.

Une étude comparative entre la protéine mutée et la protéine sauvage pourrait nous renseigner sur les éventuelles interactions et rôles de cette protéine. Notamment, une étude par retard sur gel de sa liaison à l'ADN pourrait permettre d'identifier les motifs ADN que cette protéine peut spécifiquement lier.

Pour conclure, on a réussi à confirmer que AP2X-5 interagit avec AP2X1-5 aussi que AP2X5 se fixe sur les promoteurs des gènes ROP16, ROP5 et AP2X-5 et enfin qu'il est exprimé entre la phase S et M.

## Références

- Boris Striepen mail, Carly N Jordan, SarahReiff, Giel G van Dooren. 2007. Building the Perfect Parasite: Cell Division in Apicomplexa.OPEN ACCESSREVIEW.
- BRENIER-PINCHART, PELLOUX. 2003. LA TOXOPLASMOSE - WWW-SANTE.UJF-GRENOBLE.FR
- BRUNET, Julie.2010. Altérations épigénétiques et rôle du facteur de transcription UHRF1 dans les cellules-hôtes infectées par Toxoplasma gondii. Thèses de doctorat, Université de Strasbourg.
- Carruthers, V., Boothroyd, J.C., 2007. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. Current opinion in microbiology 10, 83-89.
- Cérède O, Dubremetz JF, Soète M. 2005. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. J Exp Med. 201:453-63.
- DUBEY JITENDER. 2008.The History of *Toxoplasma gondii*-The First 100 Years.J. Eukaryot. Microbiol., 55(6), pp. 467–475.
- DARDE ML,LELU M, VILLENA I, AUBERT D, GEERS R, DUPUIS E, MARNEF F, POULLE ML, GOTTELAND C, DUMETRE A, GILOT-FROMONT E. 2012. Quantitative estimation of the viability 1 of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. Environ. Microbiol, , 78: 5127-32.
- DARDÉ, M.L. 2004. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. Ann. Inst. Super. Sanita., 40 :57-63
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S. &Speer, C. A. 1998. Structure of *Toxoplasma gondii*tachyzoites, bradyzoites and sporozoites, and biology and development of tissue cysts. Clin. Microbiol. Rev.11:267–299.
- Frenkel, J. K. 1970. Pursuing Toxoplasma. J. Infect. Dis., 122:553–559.

- Ferguson, D., 2002. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra?. Trends in parasitology. 18: 351–355.
  
- Gaji, Michael S. Behnke, Margaret M. Lehmann, Michael W. White, Vern B. Carruthers, Rajshekhar Y. 2011. Cell cycle-dependent, intercellular transmission of *Toxoplasma gondii* is accompanied by marked changes in parasite gene expression. Mol Microbiol. 79: 192–204.
  
- Gissot M, Walker R, Delhay S, Alayi TD, Huot L, Hot D, Callebaut I, Schaeffer-Reiss C, Dorsselaer AV, Tomavo S. 2013. *Toxoplasma gondii* Alba proteins are involved in translational control of gene expression. J Mol Biol. 26:1287-301.
  
- Gissot M ,Walker R,Huot L, Alayi TD, Hot D, Marot G, Schaeffer-Reiss C, Van Dorsselaer A, Kim K, Tomavo S. 2013. Toxoplasma transcription factor TgAP2XI-5 regulates the expression of genes involved in parasite virulence and host invasion.JBiolChem .43:25;288.
  
- Gordon, J.L., Beatty, W.L., Sibley, L.D., 2008. A novel actin-related protein is associated with daughter cell formation in *Toxoplasma*. Eukaryotic cell.
  
- Gubbels, M. J., White, M. and Szatanek, T. 2008. The cell cycle and *Toxoplasma gondii* cell division: tightly knit or loosely stitched? Int. J. Parasitol. 38:1343–1358.
  
- Hands-Taylor, KLD, Martino, L, Tata, R, Babon, JJ, Bui, TT, Drake, AF, Beavil, RL, Pruijn, GJM, Brown, PR & Conte, MR2010, 'Heterodimerization of the human RNaseP/MRP subunits Rpp20 and Rpp25 is a prerequisite for interaction with the P3 arm of RNase MRP RNA' Nucleic Acids Research, vol 38, no. 12, gkq141, pp. 4052 - 4066.
  
- Hartmann, J., Hu, K., He, C. Y., Pelletier, L., Roos, D. S. and Warren, G. 2006. Golgi and centrosome cycles in *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 145: 125-127.
  
- Hutchison, W. M. Dunachie, J. F. Work, K. &Siim, J. C. 1971. The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii*, in the domestic cat.Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 65:380–399.



- Huynh M-H, Rabenau KE, Harper JM. J 2003. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. EMBO.;22:2082-90.

- Julie Brunet, Alexander W. Pfaff, Ahmed Abidi, Motoko Unoki, Yusuke Nakamura, Marie Guinard, Jean-Paul Klein, Ermanno Candolfi, Marc Mousli. 2008. April *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. Cellular Microbiology. 10: 908–920.

-Lebrun M, El Hajj H, Arold ST, Vial H, Labesse G, Dubremetz JF. 2007. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog. 3:14.

-Meissner M, Reiss M, Viebig N, Carruthers VB, Tourse C, Tomavo S, Ajioka JW, Soldati D.2002. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. J. Cell Sci.115 : 563-574.

-Mercier C, Howe DK, Mordue D, et al. 1998. Targeted disruption of the GRA2 locus in *Toxoplasma gondii* decreases acute virulence in mice. Infect Immun.66:4176-82.

-Michael W. Black, John C. Boothroyd. 2000. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii* Microbiol. Mol. Biol. Rev.64:3607-623.

-Nicolle, C. & Manceaux, L. 1908. Sur une infection a` corps de Leishman(ou organismes voisins) du gondi. C. R. Seances Acad. Sci. 147:763–766.

-Splendore, A. 1908. Un nuovoprotozoaparassita de' conigli. incontratonellelesionianatomiche d'une malattiachericorda in moltipunti il Kala-azar dell' uomo. Nota preliminarepel. Rev. Soc. Scient. Sao Paulo. 3:109–112.

-Nicolle, C. & Manceaux, L. 1909. Sur un protozoaire nouveau du gondi.C. R. Seances Acad. Sci., 148:369–372.

-Nishi M, Hu K, Murray JM, Roos DS. 2008. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* 121:1559-68.

-Pelletier L, Stern CA, Pypaert M, Sheff D, Ngo HM, Roper N, et al. . 2002. Golgi biogenesis in ***Toxoplasma gondii***. *Nature.* 418:548–52.

-Sautel CF, Cannella D, Bastien O, Kieffer S, Aldebert D, Garin J, Tardieux I, Belrhali H, Hakimi MA. 2007. SET8-mediated methylations of histone H4 lysine 20 mark silent heterochromatic domains in apicomplexan genomes. *Mol. Cell Biol.* 27:5711–5724.

-SiniSkariah, Matthew Karmen McIntyre, Dana G. Mordue.2010. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitology Research.* 107:253-260.

- Striepen B, Jordan CN, Reiff S, van Dooren GG. 2007. Building the perfect parasite: cell division in apicomplexa. *PLoS Pathog.* 3:78.

-Tomavo, S. 2001. "The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of *Toxoplasma gondii*: an adaptive developmental strategy. *Int J Parasitol* 31: 1023-31.

- *Weilhammer DR, Rasley A. 2011. Genetic approaches for understanding virulence in Toxoplasma gondii. Brief Funct Genomics. 10:365-73.*

-White, R. A., Pan, Z. and Salisbury, J. L. 2000. GFP-centrin as a marker for centriole dynamics in living cells. *Microsc. Res. Tech.* 49:451-45

# Annexe 1

ATGGCGACTTTCCAAATCGACGCGTTAGACATGGGCTCCGAGGCTGGAGCGGAAAGCCAG  
ACGTTGGACAGGTCCTCGCCGTTTCCTTTCTCCGTTTTCAACTCTTCCGGCGCCGGACGG  
TGGGAGGACAGTACCCACAAAGCTCAGGAAACAGGTTTTATCCTTCGTCTCAAAACGTG  
ACGAGAGATCATGCTTCACCATTGTTTGGACAGCCGCCATTTAGTGGTCAAAATCCAGCT  
TCTGCTTGCTCCACCACAGGAACCCCCCTTTGCCAGGACGATGGGCGCAACAGCTTTCTG  
CACGCCACTCAGTCTCACGGCTACCCATCAAAGACTTTGTCACATGAGTTTTCTTACCG  
GCGCCAGAAGCGCACAAATCCAGGCGACGCTGGCTACTACCTAGCCAGCGTCCAGCGCGAA  
CATGGCGGGTGTACAGATAGCGCAGGGATGGAACCGACAAGTGTCACTCAGCAACGCTCC  
TCGAATCAGCATTGACTGTCAAAGACCAACACACCCACCGTGGTTCAAAGCCCGGCG  
CCTGATGGCGACACTTCAGTTCAGTCGTACGGTTACATTTAGCCTCTCAAGGAGTCGAC  
TATGGCTTTCCGGATACGTCCTTTCCACCAATGTACCCTGTGCATCACGAGGCGAACTCG  
TCATCGGTTATCCGGAATCCTCAGGAAAACAGAACAGAAGAGCCCGGCTCGCACCCGTCG  
GCTTCGCCACATCCTTTTTCTCCAATGCCTCGAGACACCAGTGCCACGGGCAACGGAATG  
CCGCAACATGCAGGAGAGGATTCCACCGCAGAGCGAATGCCCCGAGCGGAAAAAACTCT  
AGACCGGGCGGACCGATGGAGTGGAACACCGAATTTGCAAAGGCGGAGAACTCGCTGAAG  
GCGGCTGCGGAGGAGCTGTACTCTCATTTGCCGAATCTGCTCAGCGTCCCAGACGGTCG  
CCGTCGCCAGATTTTGGTCACAAGTCCTCCGGCAAGGGGAAAGCCCGCGCACATCCGTAT  
GCGATTCCTGTGAGTTCGTCTCCGGAGGGACGTGGTCCTGTTCTTCCGTGCCACCCTTC  
TGTCTCCCAGCTGCCTCCTCCGAGAATCACAGACAAGCGGAGAAGGGCCTCGATCAAGAA  
GCCAGGGCTCTGACGGAGGGTTGTCTTCGGGCGAATGCGTGTCTGGATTTCACCTTTCC  
TCCGATATGGAAGGCGCCAGCCCTTCGCTGGGAGCAAATTGCAGATCGAGCGGGTACACT  
CTGTCTGAGAAAACCGACAGACAGCACCCATCCAGCTTTTCTTCGTCTCTTCCCAA  
TCGTTCAGTCCGCCTCTCTCCTCGAGCCGCGACAGCCCTCGCCTCGAGCCTAAACCCGCG  
CCTGGCCAGTTGCCTGAGGACCAGCAGCGAGCGCCAGAAGACAGAGGCTTCCTAAGATT  
CTTCTCCCGCTCGACAGGAGCGCCAGGAAGGGAGCGAGGACCCGTCGCTTTTCTCTGGC  
GATGTGCAGATGCAAAGAACAGATGTTGAGGGAAACGAGAGGCAGGTGCCTAGAGTTCCC  
ACAAGTGCTGGCGGTGAACACATAGAGGAGGACCACCGGAGACAGGGACAGCTTGAGTCC  
GCTGGCCAACCCGCTGCTTCCGGAGCGCCTGCCCAAAGGCTTGGTGAAGGGGCAGGGAGA  
GGAAGTGAAGAAGTGAACGCTCTGGGTGTCTTCGAGAGTGTCTAGGGGAGGACAGACAA  
GCTGACGAAGAAGGCGACGCGCATCGGAGGGCACTGGAGGCCGAGGCGCCGCCCTCAGTG  
AAGCGGAGGCGCGGACCTGCACAGCCAGCGAAGATGTATTTCCACAAGAAAAAGGAGGCA  
TGGCGAGCTGAAGTTCTCATCGATGGAACGAAACGCCAAAAGAGTTTCTCTTGCAA

GTGTAC

GGTGAGCCACGGGCGCGGATGCTGTGCGAATGGGCCCCGACGCTTCGCTCGAGACTTCGGG  
CGACTCCCCTCCAACCAGGACGTCGCCAACTACATCCCGTGTCTGCCAAGGTGTCGGCCA  
GCGCCTCGCGGGAATGACGACCGCGGCGAGCCAGCCACGACGCACTCGGAAGGCTCGTAC

TTTGCTTCGTTCCCTCACTCGTTTGCAGCCACGCCGCGCCTCCAGATATCGACGCGGAG  
GACGGGGCCTCCGCAGGCCCGCCATGTCTCAGGGCCGTTTTTTCGGGCGGGGTAGGA  
GCTCCTGACTGCGTGCACTCATGGCCAAATGCGGATGTTCAACTCGGCGCAGGCCAAT  
AGTCAGGGAGGGGAATTCAGGCCATTCTTGACCCCCGAGGGGTGGAGAGAGACGGACACC  
AGCAGAGAGATGTGGCAGAAGGCCACGGAAGCGGAGAAGGCGCGGGCACAGTCGAGATA  
TCTCAGAACTCCGACCAGATGAGTCGAGCTCAGATGTACCACCCGCTTACAGCCATAC  
GGCCAGATGCCGCAGCAGAGCTACTACGCGCCGAGGGAATGGGTGAGAGGCCAGACAAC  
GAGGTTCTGACCTTCCACTGCAGCCGGCAGCGTCTTCCCATCAGCGACGACACAGCG  
TGGTCTGCGCGGCCTGAGGCCTTCTGGAGCGCAGCAACCGCGGCGTCCCCGCACCAGCCA  
CAAGCGTGGATAGACGGGAGGCGCAAGGATGAGGGATTGACTTCGTTGAAAATTCTTT  
TCGGGCGGCCGAATGCGCTCAGCTGGCCACAAGGCCCGTGCAAGGTGGCGAAGAATTG  
CAGCGGCGCTTCGCATGCACTCAGGACGCGAGACAAGACGTTAGACCGACAGGGAGAGC  
CACGCGCAAGGCACAGGTCTCCGTGCCTCGCCTCCGGACTTTTTCTACGCTGACTCGAAC  
GCCTCGAACGCGCCACGCGTCGGGCCTCAACCCTTCAACGTCGAAGCTGAATGCCAGGAA  
CGCATGCGCGTAGAGCGCGCGGGAGGGGCGGGCGCGCCTCGGAGAGGTCTCGAGCGT  
CAGTCTCAGGTCCCGGTGGAGAGCGCGGGAGACGGTTTCAAGTTCAGTTTGGTAATCCG  
CGACCCAGTCGTTTTTAATACACACTTCTGTGGGCCTGGCGGGCCACACATGCCGCCG  
TTCCAGATGTACGCTTCTCCGACCAGCCGGGGGCTCCGCCTCAACAGCTTGAGCAAGCT  
CTTCGAGGCGGCGCCGTGTACCCTAACTTTCTCGATGGAAGGTCCCCGAAAAGGTCCCG  
CAGATGTGTCGCCCGCTTCGCCCTTCTCTTCGTCGACCTGCGCCGGGGCGAGTGTGGCG  
TCGTTCCCTTCTTCGTCTGTCTCCGCGGCAGGCGTCTCCGGGTCTGCGCTCGCCGCTGCA  
ACAGAGCTGCCCTTCTCTCCGTTTCTTCGCCCTTCATCTCTGACGGGCCCCCTCCGCGG  
CTTCCCTTTTCGGCGCCGCCCTATGCGAGTTCGGGCGACGAGGTGTTCTCCGGGCTCCC  
CCCTGCATACCCTCAGGACAGGCAGGCGGACCCAGCCAGCCGTGCGGACCCTTCTACCTT  
TCTTCGGGGTTCCTAGACACCAGCGCGCCCTACTACTCTCCGCCGGCGCCCCAGGGACAT  
GCGACTCCGGTCCCCACTTAGGAATGTGTTACCACCCTTCGCTCGTTCGGGGTCTACT  
CACGGCAGGTTTTACGGCCAGGCGCCTTGCAGACAGGTGCGAGCACGCATGCGCCTCGGGG  
CCGACTCTCGGGGCTGTGAGCTGGCGGCAGAAGTCGCTGCGACGGCGCTGTGACTCTG  
GACAAGCAGAGCTTCGACTCTCTTTTTGCAGACCCTCCAGGAGCTGAACCGCGAGAAA  
GGCGGGGCGGCAGGTTCTGCCGACCGTCCGCGGTCTCTAGATCTTCTTCACTGTCCCC

CTCCCCCTTCTGCACCAGGCCAGCAGCCTCTTGAACCAGATGGAAGACCCCTTCTCGGGA  
ATCGCCCTTGACCCCTTCGGCCAGGGTGTAGCCACCTTGGTGCTGCCAGCCACGAGTGAC  
TATTTGCATCGTCTTCCTTTCGTTGGAGCCTCAGCGGTGCTTCGATGGGTGCGCCAGCA  
GGCGGTGAGTCGTGTTTCGCTCCCCCTGAGGCGAGTGGATGCATCGAAACGGCGCCGAAC  
CCGCTACGAGGCGGCGAGGTCAAAACCGGAAGCGTCTTCGGAGACACGGGGAAGAGACA  
CGGCCAGGTGAGGCGGACGCAAGCAAGGCGAGTTGCTTGGAGCGGTCCCGCGCGGGTGGC  
ATGGGCGAGGAGGGGGAGGGTGAGAGACACCGCAAGACCAGCGGTGTGGCGACGAGGAT  
GAGGAAGGCTTCAGCGCCTTTGTACAGAAACGAAGAGAAATGAACATTGCGGCGGGGGCG

CGGTTTCGAGGAACTTGACGGCCTAAAAAGCCTCACCAGACCCCGAGGTGGCAGAACCAAG  
 CGGTTCAATGTGCGCAAAAAACCCTTCAGCGGAGTCCGCGGAATCTACTTTCAACAGGGA  
 GCTTGGAAG  
 GTCCGCTACCGAGGTGA  
 CCAGGAGGAGGTTTTGAAGGTCTTTCCTACGCCAGCGGGGACTTCGACA  
 GTATGTGGTTCCAGTTTCTGCTGGCTCGGCAGTTCCTCCGGCAAGTCATCGCGAAAGGCC  
 GCCAGCTACACGACAGCGACGGAGAAGGTCTCTCGGACGAAGAGCCCG  
 CGTGGATTCTGAGGCACGACGACGAGTGCAG

TAGTGCGACTCGGCGTGCGGACTCTGGGCGGCCTCGGCGGGGACTGCAGGCGTCTTCTTC  
 TTCTTCGCGTTTCATCTTCTCTCTCGGCGTCTCAGTCTCGACAGGGGCGGCGGTTCGGACGG  
 TTCCTTCGTGGAGTGACGAGCGCCACTGGTTCGGCGTCGCAACGACCCGTCTGCCGACTC  
 GCGTGCTTCTGGAAGAGTTGGGAGAGCCGTTGCCCTCAGCGGAGCTTCGCTCGGTTCCCT  
 CGGAGAGACAGCTGCAGGCGAGGGCGCCGACGACTGGGGGCGCGCTGTCTCGTTTCT  
 CGGGAGAGACCGCAAGTGCCAAGAGCGCGGCCCGAGTCAGAGCGGCGCATGCAGACGGCT  
 GGACGCGGCCGTTGAGAGTCTCCGTCCAATCTCAAGCACCGACTTCTTCGAGCCCATTTT  
 CTTCCCCGCTCTCTTCGGCCCCGCCAGCGAAAAGTGGGGTGTGCGCGCCGACAGAGTCAG  
 GGACGACGTGGAGGACCTCGAGAAACAGCGCCTGGCTTCACCTCATGCCCCGCGGAGACAA  
 CGGAGACAGTGGAGACAGTGTAGCCACGATGGAGAAGAGTCAGGGCGAGGCCGCATGTGG  
 AGAGGGCGAGAAGAGAAGAAGGCTGTCCAGAGAGGTGAAGGCTCGCACGCCTCGAAGGT  
 TGGAGAGGTGGTGGAGGAACTTGACACCCTCGAGAAGTGCCGGAGAAGTCTTTGCAGCCA  
 GGAGGAGAAGGACAGCATTTCGGAAGTCTGTGCAACGGAGCAGACGGTGGGGACCGGCAG  
 AGACTGTGGAGAGAAGCCGGAGGTGGAGGGGAGTGTTCGCTTGCTCTGGACTCTGCGTG  
 CTCTCTCTCGGCGTTTTCCCTCTCGTTTTCGGGATCCGAGAAGAACGTAGGGGGAGAGCC  
 GCAGGTCTGAAGACGGGAGAGAGGAAGCCCGAACGCGAGCAGACACGAACGACCACAAGTC  
 CGCATCGGTGTGACAGACGCCTTTGATCTCTTGAGGAGCCGACGTTCTCGAAGGCGAC  
 TTCTCCACGGGACCCTCGAGAGAAAAGGAGTTCCAGCTCGTCGCCTCGTACCCTTGGA  
 TCTTTCTGGGGAGATGCTCGCGAGAAAGGCCAGTCTGGGTGGCACTCGTTGCCGCACCT  
 GCCTCTTCTTCTCCAGGACCGACACGACCGAGTCCTCGCTTCTCGTTTGGTCC

X5-1_fwd	taaccaagatccacttgaccATGGCGACTTTCCAAATC	3'Tm=60.0 3'Ta(annealing temp)=58.7
X5-1_rev	caccgtacacTTTGCAAGAGAACTCTTTTG	3'Tm=58.7 3'Ta(annealing temp)=58.7
X5-2_fwd	ctcttgcaaaGTGTACGGTGAGCCACGG	3'Tm=65.5 3'Ta(annealing temp)=63.7
X5-2_rev	gaagggggagGGGGACAGTGAAGGAAAGATC	3'Tm=63.7 3'Ta(annealing temp)=63.7
X5-fgmt_fwd	cactgtccccCTCCCCCTTCTGCACCAGG	3'Tm=69.3 3'Ta(annealing temp)=69.3
X5-fgmt_rev	agtcgcactaCTCGCACTCGCTGCGTCG	3'Tm=72.3 3'Ta(annealing temp)=69.3
X5final_fwd	cgagtgcgagTAGTGCGACTCGGCGTG	3'Tm=68.9 3'Ta(annealing temp)=66.8
X5final_rev	tgctatacgaagttattaattaaGGACCAAAACGAGGAAGCG	3'Tm=66.8 3'Ta(annealing temp)=66.8

## Annexe 2

ROP16promo\_F\_qPCR ATCTGTGTGGCATCTGCAAG

ROP16promo\_R\_qPCR AGACTCGCTCGGAATGTTTG

ROP5promo\_F\_qPCR TTCCGGACCTTGTCTTTGTG

ROP5promo\_R\_qPCR CAAACCTTGTTCCCATCACC

ROP18promo\_F\_qPCR TGAATTAGGCCTGGTCGTTT

ROP18promo\_R\_qPCR CCGGTTTGATATCCGTATGC

AP2XI-5F CATTCGCGAGAGAGATGGTC

AP2XI-5R CCTCGCTGTGTCTTCTTTCC

TGME49\_068700 F (neg) AAGCTGGAATTCGTCACCAC

TGME49\_068700 R (neg) CAAGACGAACAGCCAGACAA

## **Résumé :**

*Toxoplasma gondii* possède des facteurs de virulence et d'invasion qui lui sont primordiaux pour sa survie. L'expression de ces facteurs est étroitement contrôlée au cours du cycle cellulaire du parasite pour permettre leur adressage correct dans des organites sécrétoires. Cependant, peu d'informations sont disponibles sur les facteurs qui contrôlent l'expression de ces gènes. Dans ce contexte, nous avons tenté caractériser la protéine AP2X-5, un nouveau facteur de transcription de la famille des AP2 qui pourrait être impliqué dans le contrôle transcriptionnel de l'expression de ces facteurs de virulence. Nos résultats d'Immuno-empainte ont confirmé qu'AP2X-5 interagit avec un autre facteur AP2, AP2XI-5, qui est impliqué dans le contrôle de l'expression des gènes exprimés en phase S et M du cycle cellulaire, y compris les facteurs de virulence. Des analyses d'immunoprecipitation de la chromatine ont permis d'observer un enrichissement de la protéine AP2X-5 au niveau des promoteurs des gènes codant pour des protéines de rhoptrie, ainsi que pour le promoteur du gène AP2XI-5. Enfin, un suivi du cycle cellulaire a permis de confirmer qu'AP2X-5 est exprimé entre la phase S et M. Ces données semblent indiquer qu'AP2X-5 pourrait être impliqué dans le contrôle de l'expression des facteurs de virulence.

Mots clés : *Toxoplasma gondii* ; AP2; virulence des parasites; facteur de transcription; régulation de l'expression

## **Abstract:**

*Toxoplasma gondii* encodes several factors of virulence and invasion which are critical for its survival. The expression of these factors is closely monitored during the cell cycle of the parasite to allow their correct packaging into secretory organelles. However, little information is available on the factors that control the expression of these genes. In this context, we decided to characterize the AP2X-5 protein which belongs to the AP2 family of transcription factors. Our results of Immuno-blotting have confirmed that AP2X-5 interacts with another factor AP2, AP2XI-5, which was shown to be involved in regulating expression of virulence factors. Chromatin immunoprecipitation analysis allowed us to observe an enrichment of the AP2X-5 protein at the level of promoters of genes coding for rhoptry proteins, as well as the promoter of the AP2XI-5 gene. Using immunofluorescence, the AP2X-5 protein expression was observed between the S and M phases of the cell cycle but not the G1 phase. These data indicates that AP2X-5 may play a role in regulating expression of important virulence factors.

Keyword: *Toxoplasma gondii*, AP2; virulence; transcription factors.